

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**QUITOSANO, UN BIOPOLÍMERO CON
APLICACIONES EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN
CONTROLADA DE FÁRMACOS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ruth Expósito Harris

Bajo la dirección de los doctores

Ángeles María Heras Caballero
Niuris Acosta Contreras

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-5983-9

© Ruth Expósito Harris, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



QUITOSANO, UN BIOPOLÍMERO CON APLICACIONES EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Dña. Ruth Expósito Harris

DIRECTORES DE TESIS:

Ángeles María Heras Caballero

Niuris Acosta Contreras

Madrid, 2009

Agradecimientos

Durante estos años he recibido el apoyo de muchas personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

Agradezco a mis directoras de Tesis, las Dras. Ángeles Heras y Niuris Acosta el apoyo y el ánimo que me han brindado durante este tiempo y, sobre todo, el haberme dado la oportunidad de trabajar con ellas. A Ángeles tengo que agradecerle el ánimo que me ha dado día tras día para que todo el trabajo realizado durante estos años tuviese su fruto en esta memoria de tesis. A Niuris, agradecerle el esfuerzo por ayudarme aun trabajando en otro centro.

Expreso mi agradecimiento al Instituto de Estudios Biofuncionales y al Departamento de Físico-Química II de la Facultad de Farmacia, en las personas que ocupan su dirección, el Dr. José González y el Dr. Pedro Antonio Galera, respectivamente. Gracias también a la Dra. Begoña Elorza, investigadora principal de los proyectos MAT 2004-03982 y MAT2007-63757 del Ministerio de Ciencia e Innovación, durante los años que la Dra. Ángeles Heras estuvo en comisión de servicios en el Ministerio de Sanidad y Consumo.

El agradecimiento más grande de todos va dirigido a mi familia, sobre todo a Sergio, a David y a mi madre, porque esta Tesis es una realidad gracias a ellos, a su apoyo incondicional, desde el principio. Mención especial para Sergio, por su ayuda y su paciencia y por estar ahí en los momentos buenos y malos. Gracias también a los que están lejos y a los que ya no están, sobre todo a Paquita, porque sé que le hubiese gustado estar aquí y ver mi Tesis terminada.

He tenido la suerte de conocer a gente maravillosa en el Instituto de Estudios Biofuncionales. Gracias a mis niñas, Marian, Carol, Ana y Alba, que han estado conmigo desde el principio de esta andadura y con quienes he compartido tantos momentos. A las que llegaron después, Inma, Susana y Elena, por sus consejos, su ayuda en estos últimos meses y su amistad. Y por supuesto, a Bea, Inma y Gemma, por ayudarme en mis inicios. No me olvido de Inés, probablemente a quien le debo que el tema de mi tesis sea el que es y quien me ayudó y apoyó durante los primeros años. Al resto de compañeros del Instituto y del CAI de RMN, gracias por los consejos, las risas y todos los buenos momentos.

He disfrutado de una estancia en la Universidad de Nottingham. Quiero mostrar mi agradecimiento a las Prof. Lisbeth Illum y Snow Stolnik el haberme dado la oportunidad de realizar parte del trabajo experimental de la Tesis en su grupo de investigación. Gracias a mis compañeros allí, a Driton y Emilia, por dedicar su tiempo a enseñarme y ayudarme en el laboratorio.

Gracias a la Red Alfa II 0259 de la Unión Europea disfruté del curso “Biopolymers in materials and life sciences” en la Universidad de Potsdam (Alemania), una de las mejores experiencias que he vivido.

En la Universidad Complutense también debo mostrar mi agradecimiento a Eugenio y Alfonso, del CAI de Microscopía y a Fernando, del CAI de Rayos X.

Quiero agradecer a la empresa Vegal Farmacéutica S.L., con la que el Instituto de Estudios Biofuncionales mantuvo un contrato artículo 83, el financiar esta tesis durante el primer año.

Esta tesis se ha realizado con la financiación de dos contratos asociados a los proyectos MAT 2004-03982 y MAT 2007-63757 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Muchas gracias a todos, de corazón.

FRUTO DE ESTA TESIS HAN SIDO:

Publicaciones:

- I. Paños, R. Harris, N. Acosta, B. Miralles, A. Heras “*Study of the amount of chitosan bound to alginate in polyelectrolyte complexes*”. Advances in Chitin Science, Vol IX (2006). Eds. A. Domard, E. Guibal, K. M. Vårum. Pags 637-644.
- R. Harris, I. Paños, N. Acosta, A. Heras. “*Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of tramadol*”. Journal of Controlled Release (2008), 132 (3), e76-e77.
- Inmaculada Aranaz, Marian Mengíbar, Ruth Harris, Inés Paños, Beatriz Miralles, Niuris Acosta, Gemma Galed, Ángeles Heras. “*Functional characterization of chitin and chitosan*”. Current Chemical Biology (2009), 3, 203-230.
- B. Miralles, M. Mengíbar, R. Harris and A. Heras. “*Suitability of a colorimetric method for the selective determination of chitosan in dietary supplements*”. Food Chemistry. Aceptado Julio de 2009. Ref: FOODCHEM-D-09-01275R1.
- Inmaculada Aranaz, Ruth Harris and Angeles Heras. “*Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications*”. Current Organic Chemistry. Aceptado 2009.
- R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, M. Mengíbar, A. Heras. “*Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants and their application in cosmetics*”. Carbohydrate Polymers (En revisión: CARBPOL-D-09-00950).
- R. Harris, N. Acosta, A. Heras. “*Novel chitosan hydrochloride - genipin microspheres for controlled release of tramadol hydrochloride*”. Journal of Microencapsulation (Enviado: TMNC-2009-0197).
- E. Lecumberri, R. Harris, A. Heras. “*Chitosan microspheres crosslinked with genipin for controlled release of drugs*”. En elaboración para enviar a la revista Marine Drugs.
- R. Harris, I. Paños, N. Acosta, A. Heras. “*New chitosan films for controlled release of ciprofloxacin hydrochloride*”. En elaboración para enviar a la revista “Drug Delivery”.

- D. Vllasaliu, R. Harris, L. Casettari, A. Heras, L. Illum, S. Stolnik. “*Tight junction modulation of chitosan solution and chitosan nanoparticles*”. En elaboración para enviar a la revista “Journal of Controlled Release”.

Contribuciones a congresos internacionales:

- I. Paños, R. Harris, I. Aranaz, G. Galed, N. Acosta, A. Heras. “*Chitosan films for the controlled release of ciprofloxacin HCl*”. IV Congreso Internacional de Biomateriales, BIOMAT, La Habana, Cuba, 2006. (Póster).
- I. Paños, R. Harris, B. Miralles, N. Acosta, A. Heras. “*Study of amount of chitosan bound to alginate in polyelectrolyte complexes*”. 10th International Conference on Chitin and Chitosan. 7th International Conference of the European Chitin Society. Montpellier, Francia, 2006. (Póster).
- I. Paños, R. Harris, B. Miralles, N. Acosta, A. Heras. “*Chitosan films for controlled release of ciprofloxacin*”. IV Simposio Iberoamericano de quitina, SIAQ. Natal, Brasil, 2007. (Póster).
- I. Paños, R. Harris, N. Acosta, A. Heras. “*Sustained release chitosan microspheres prepared by a w/o/w emulsion-spray drying method*”. 34rd Controlled Release Society Meeting. Long Beach, California, EE.UU., 2007. (Póster).
- R. Harris, I. Paños, N. Acosta, A. Heras. “*Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of tramadol*”. 10th European Symposium of Controlled Drug Delivery. Noordwijk aan Zee (Holanda), 2008. (Póster).
- R. Harris, I. Paños, N. Acosta, A. Heras. “*Chitosan-genipin microspheres prepared by spray-drying: characterization*”. World Meeting in Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Barcelona, 2008. (Póster).
- R. Harris, N. Acosta, E. Lecumberri, A. Heras. “*Novel chitosan hydrochloride-genipin microspheres for controlled release of tramadol hydrochloride*”. Controlled Release Society. Copenhagen (Dinamarca), 2009. (Póster).
- E. Lecumberri, R. Harris, A. Heras. “*Chitosan microspheres crosslinked with genipin for controlled release of drugs*”. European Chitin Society. Venecia (Italia), 2009. (Póster).
- R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, M. Mengibar, S. Iglesias, A. Heras. “*Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants and their application in cosmetics*”. 11th International Conference on Chitin and Chitosan. Taipei (Taiwan), 2009. (Póster).

- A. Heras, R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, M. Mengíbar. “Chitosan and co-passengers. Functional applications”. 11th International Conference on Chitin and Chitosan. Taipei (Taiwan), 2009. Keynote lecture.
- A. Heras, R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, M. Mengíbar. “Quitosano, biopolímero creador de sinergias”. V Iberoamerican chitin symposium. Chile, 2010. Plenary conference.

Congresos nacionales:

- R. Harris “Películas de quitosano para la liberación controlada de fármacos”. II Jornadas Complutenses y I Congreso Nacional de Investigación para alumnos de pregrado en Ciencias de la Salud. Facultad de Farmacia, Madrid, España, 2007. Comunicación oral.
- Estancias en centros extranjeros
- Estancia de cuatro meses en la Universidad de Nottingham (Reino Unido). Drug delivery and tissue engineering department. Febrero-Mayo 2008.

Actividades de transferencia de tecnología:

Integrante del equipo promotor de la empresa de base tecnológica (EBT) InFiQuS.
Fecha: 2009

Informes a empresas:

1. Matrices de liberación controlada a base de quitosano: aplicaciones a la claritromicina y a la venlafaxina. Vegal Farmacéutica S.L. Marzo 2007.
2. Matrices de liberación controlada a base de quitosano: aplicaciones a la claritromicina y a la venlafaxina. Vegal Farmacéutica S.L. Junio 2007.
3. Matrices de liberación controlada a base de quitosano y genipina. Laboratorios ROVI S.A. Junio 2008.

Abreviaturas

ANOVA:	análisis de la varianza de una vía
CS:	quitosano
DRX:	difracción de rayos X
EE:	eficiencia de encapsulación
FFLM:	formas farmacéuticas de liberación modificada
FT-IR:	espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
FD:	dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (del inglés “FITC-Dextran”)
GD:	grado de desacetilación
Gnp:	genipina
HBSS:	solución salina equilibrada de Hank (del inglés “Hanks balanced salt solution”)
HCS:	hidrocloruro de quitosano
LD 50:	dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba (del inglés “lethal dosis”)
LDH	test de citotoxicidad en el que se determina la liberación de lactato deshidrogenasa de las células
MTS	ensayo de citotoxicidad en el que se utiliza una sal del tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazolio)
PBS	tampón fosfato salino (del ingles “phosphate buffered saline)
RA:	rendimiento de atomización
SD:	desviación estándar (del inglés “standard deviation”)
SEM:	microscopía electrónica de barrido (del inglés “scanning electron microscopy”)
SGF:	fluido gástrico simulado (del inglés “simulated gastric fluid”)
SIF:	fluido intestinal simulado (del inglés “simulated intestinal fluid”)
TPP:	tripolifosfato sódico
UV:	ultravioleta
UV-Vis:	ultravioleta-visible

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	15
1 Sistemas de liberación modificada	17
2 Polímeros utilizados en sistemas de liberación de fármacos.....	18
3 Quitosano: Características, propiedades y aplicaciones.....	19
4 Microesferas y nanopartículas de quitosano	22
5 Películas de quitosano	25
5.1 Hinchamiento de las películas de quitosano	26
6 El quitosano como promotor de la absorción de fármacos	28
7 Cultivos celulares como modelo epitelial	32
8 Agentes entrecruzantes.....	34
9 Fármacos empleados	38
10 Modelos matemáticos.....	42
II. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1 Materiales	51
2 Obtención de microesferas de hidrocloreuro de quitosano.....	52
3 Obtención de películas de quitosano	53
4 Obtención de nanopartículas de hidrocloreuro de quitosano	54
5 Caracterización.....	54
5.1 Estudios de morfología	54
5.2 Determinación de la carga eléctrica superficial de microesferas y nanopartículas	55
5.3 Estudios de interacción fármaco-polímero	56
5.3.1 Difracción de rayos X	56
5.3.2 Espectroscopia de infrarrojo.....	56
5.4 Reacción de entrecruzamiento del hidrocloreuro de quitosano y la genipina	57

5.5	Determinación del grado de entrecruzamiento con genipina.....	57
5.6	Estudios de hinchamiento de las películas de quitosano	58
5.7	Determinación de la cantidad de quitosano unido a las nanopartículas.....	58
6	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	59
6.1	Microesferas de claritromicina	59
6.2	Microesferas de hidrocloreuro de tramadol.....	60
6.3	Películas de quitosano con hidrocloreuro de ciprofloxacino.....	61
7	Cultivos celulares	61
7.1	Células Calu-3.....	61
7.2	Ensayo de toxicidad MTS.....	62
7.3	Ensayo de liberación de LDH.....	63
7.4	Determinación de la resistencia transepitelial.....	63
7.5	Ensayos de permeabilidad celular.....	64
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
1	Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con claritromicina obtenidas por atomización.....	71
1.1	Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con claritromicina entrecruzadas con tripolifosfato sódico	71
1.1.1	Obtención de las microesferas.....	71
1.1.2	Estudios de morfología.....	74
1.1.3	Determinación de la carga superficial de las microesferas	75
1.1.4	Interacción fármaco-polímero	77
1.1.5	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	78
1.2	Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con claritromicina entrecruzadas con genipina	90
1.2.1	Obtención de las microesferas.....	90
1.2.2	Estudios de morfología.....	90
1.2.3	Determinación de la carga superficial de las microesferas	91
1.2.4	Interacción fármaco-polímero	91
1.2.5	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	92
1.3	Conclusiones parciales del capítulo	95
2	Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con hidrocloreuro de tramadol obtenidas por atomización	97
2.1	Reacción de entrecruzamiento del hidrocloreuro de quitosano y la genipina	97
2.2	Determinación del grado de entrecruzamiento	101
2.3	Obtención de las microesferas	103
2.4	Estudios de morfología	104
2.5	Determinación de la carga superficial de las microesferas.....	105

2.6	Interacción fármaco-polímero.....	106
2.7	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	108
2.8	Conclusiones parciales del capítulo	117
3	Películas de quitosano con hidrocloreto de ciprofloxacino	119
3.1	Obtención de las películas	119
3.2	Estudios de morfología	120
3.3	Grado de hinchamiento de las películas	121
3.4	Estudios de interacción fármaco-polímero	124
3.4.1	Difracción de rayos X	124
3.4.2	Espectroscopía de infrarrojo.....	128
3.5	Ensayos de liberación <i>in vitro</i>	131
3.6	Conclusiones parciales del capítulo	136
4	Estudio del efecto del quitosano sobre las uniones estrechas de células Calu-3.....	139
4.1	Obtención y caracterización de nanopartículas de hidrocloreto de quitosano .	140
4.2	Estudios de citotoxicidad	142
4.2.1	Ensayo de MTS	142
4.2.2	Ensayo LDH.....	144
4.3	Estudio de la resistencia transepitelial	146
4.4	Ensayos de permeabilidad celular.....	150
4.5	Conclusiones parciales del capítulo	151
IV. CONCLUSIONES		153
V. BIBLIOGRAFÍA.....		157

OBJETIVOS

Siguiendo la línea de investigación del grupo “Investigaciones en el Sistema Quitina-Quitano” y dentro del área de sistemas de liberación controlada de fármacos basados en quitosano, en esta Tesis se ha dado un paso más en el conocimiento del quitosano y las potenciales aplicaciones de este biopolímero en el campo de la tecnología farmacéutica.

Así, el objetivo general de esta Tesis ha sido, por una parte obtener microesferas, películas y nanopartículas de quitosano para la encapsulación de fármacos y, por otra parte, estudiar la citotoxicidad del quitosano y su capacidad como promotor de absorción de macromoléculas en monocapas de células Calu-3.

Este objetivo general podría desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

- Obtención, caracterización y estudio de la liberación *in vitro* de microesferas de hidrocloreto de quitosano como sistemas de liberación controlada de claritromicina e hidrocloreto de tramadol para administración oral.
- Obtención, caracterización y estudio de la liberación *in vitro* de películas de quitosano como sistemas de liberación controlada de hidrocloreto de ciprofloxacina para uso tópico.
- Estudio del efecto del quitosano, en solución o en nanopartículas sobre una línea celular de epitelio respiratorio: citotoxicidad, apertura de uniones estrechas y permeabilidad celular de macromoléculas.

I. INTRODUCCIÓN

1 Sistemas de liberación modificada

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), también llamadas de liberación controlada, ha suscitado gran interés en la industria farmacéutica. Se trata de dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos. De acuerdo con la Real Farmacopea Española [1], las FFLM son aquéllas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía. En ellas se introducen modificaciones en la formulación o en el proceso de producción con el fin de alterar la velocidad, el tiempo o el lugar de liberación del fármaco [2]. De esta forma se pueden alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco en el lugar de acción y mantenerlos a lo largo del tiempo. Como consecuencia, las FFLM presentan numerosas ventajas con respecto a las formas farmacéuticas convencionales [3]:

- Disminución de la frecuencia de administración del medicamento, mejorando de esta forma el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.
- Reducción de los efectos secundarios relacionados con dosis elevadas.
- Disminución de la fluctuación de niveles plasmáticos.
- Efecto terapéutico más uniforme.

Sin embargo, también existen algunos inconvenientes, entre los que hay que destacar [3]:

- Coste elevado.
- Correlaciones *in vitro/in vivo* difíciles de predecir.
- Posible sobredosificación por liberación inmediata e incontrolada de la dosis.
- Dificultad en el ajuste de la dosificación.
- Dependencia del tiempo de tránsito intestinal en las formas de administración oral.
- Riesgo de acumulación del fármaco y necesidad de ajuste de pautas posológicas.

En la Tabla I.1 se resumen los principales tipos de liberación modificada [4, 5]:

Tabla I.1. Características y ejemplos de los diferentes tipos de liberación modificada.

Tipo de liberación	Características principales	Ejemplos
Prolongada o controlada	Diseñadas para garantizar una liberación más lenta del fármaco.	Comprimidos o parches lipídicos, hidrofílicos o de polímeros insolubles.
Retardada	Retrasan la liberación del principio activo. No prolongan el efecto terapéutico.	Sistemas de cubierta entérica o formas farmacéuticas gastrorresistentes.
Pulsátil	Modificadas para garantizar una liberación secuencial del fármaco. Normalmente presentan dos fases: una inmediata y otra al cabo de un tiempo.	Sistemas que pretenden hacer coincidir la liberación del fármaco con ciclos circadianos hormonales.
De control espacial	Liberan el principio activo cuando la forma farmacéutica alcanza su lugar de acción.	Sistemas bioadhesivos.

Los sistemas de liberación modificada también se pueden clasificar en función del mecanismo por el cual se libera el principio activo. La liberación puede ocurrir por difusión, disolución, presión osmótica, fuerza mecánica, hinchamiento, erosión o activación [2].

2 Polímeros utilizados en sistemas de liberación de fármacos

Actualmente, en la elaboración de sistemas de liberación controlada, se utilizan un gran número de polímeros. Existen dos grandes grupos de polímeros:

- Polímeros naturales, como el colágeno, la albúmina o el quitosano.
- Polímeros sintéticos, entre los que se distinguen:
 - Polímeros biodegradables, como los ácidos poliláctico y poliglicólico.
 - Polímeros no biodegradables, como los ácidos poliacrílicos.

Tanto los materiales empleados en el desarrollo de los sistemas de liberación así como sus productos de degradación han de ser biocompatibles.

La liberación del fármaco desde una matriz polimérica puede deberse a tres tipos de mecanismos: liberación desde la superficie de las partículas, difusión a través de la matriz hinchada y liberación debido a la erosión del polímero. En la mayoría de los casos, la liberación se debe a más de uno de estos mecanismos [6].

En el caso de la liberación desde la superficie, el fármaco atrapado en la capa superficial de las partículas se disuelve instantáneamente al entrar en contacto con el medio. Esto provoca el llamado efecto estallido, del inglés “burst effect”, que puede evitarse utilizando agentes entrecruzantes o lavando las partículas con solventes apropiados, lo cual puede conducir a una baja eficiencia de encapsulación.

La liberación por difusión implica tres etapas. En la primera, el agua penetra en el sistema, lo que hace que la matriz se hinche; en la segunda, el polímero cristalino se convierte en una matriz hidratada; y en la tercera, se produce una difusión del fármaco a través de dicha matriz hidratada. La velocidad global del proceso vendrá determinada por la velocidad de cada etapa. Ajustando experimentalmente las variables adecuadas se puede conseguir la velocidad de liberación del fármaco idónea. Este tipo de liberación es típico en hidrogeles.

En el caso de polímeros biodegradables, el principio activo puede liberarse por erosión de la matriz en la que está encapsulado.

3 Quitosano: Características, propiedades y aplicaciones

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Se trata además de un subproducto importante de varias industrias como la pesquera y la cervecera. La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica [7].

La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, si bien este

proceso nunca llega al 100% [8]. Es por ello que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa (Figura I.1).

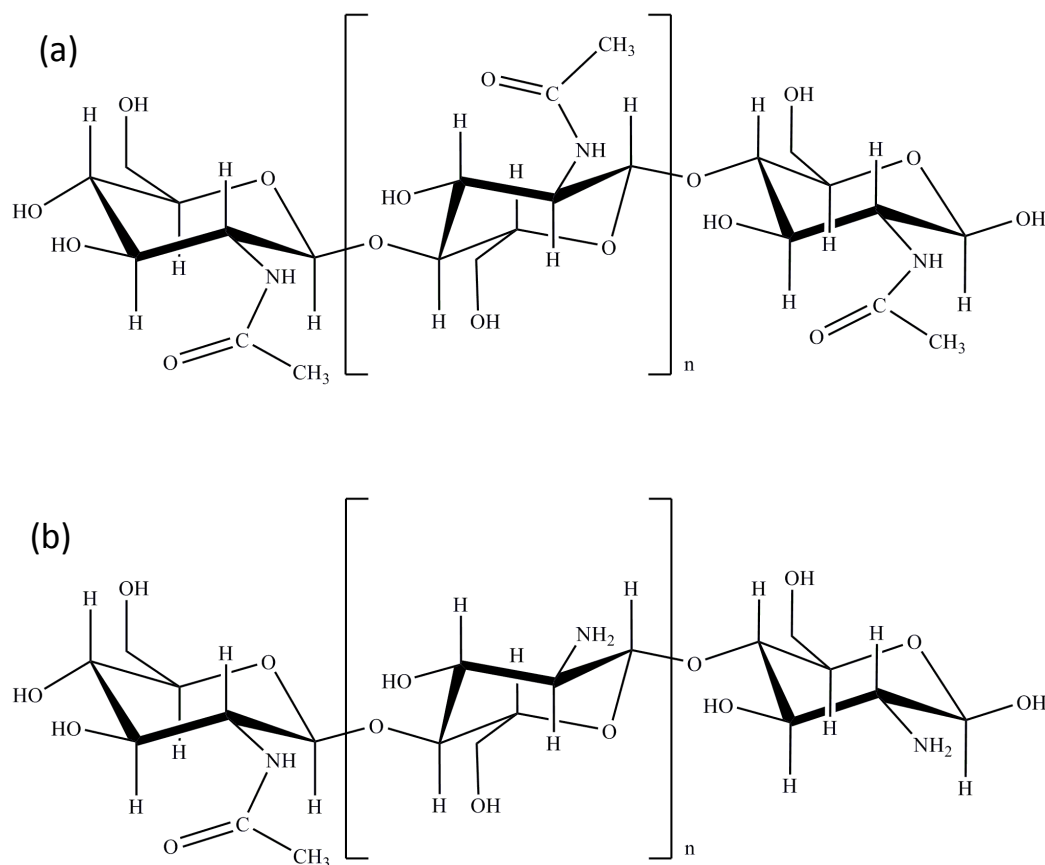


Figura I.1. Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).

La fuente y el método de obtención determinan la composición de las cadenas de quitosano y su tamaño. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son dos parámetros de obligado conocimiento para la caracterización de este polímero.

Las principales propiedades físico-químicas del quitosano que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio, aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas también son características físico-químicas a considerar para la aplicación de un quitosano específico.

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-aceto, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluídas (acético,

fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6,5 [9]. La protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo.

El quitosano es un polímero formado por unidades repetidas de D-glucosamina, por lo que la longitud de la cadena y, por tanto, su peso molecular, es una característica importante de la molécula.

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, antiolesterolémica y antioxidante [10]. Estas propiedades funcionales han promovido su utilización en varios campos distintos como son agricultura, industria y medicina. En agricultura, el quitosano se ha descrito como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. Así mismo se ha investigado como agente quelante de metales en agricultura e industria y como agente filmogénico en cosmética [11]. También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en el tratamiento de aguas residuales [12]. En la industria alimentaria se puede utilizar como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además, tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos [10]. Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica [13] y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas [14].

Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [15, 16]. En este sentido, hay que destacar que el hidrocloreto de quitosano fue aprobado por las autoridades e incluido en la cuarta edición de la Farmacopea Europea (2002) [17].

Constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio. Así mismo, el quitosano presenta propiedades necesarias para su uso en dicha industria, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad. La toxicidad del quitosano por vía oral es baja; se ha descrito una LD₅₀ (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16g/Kg en ratas [18]. El grado de desacetilación y el peso molecular promedio del quitosano son dos características físico-químicas

fundamentales, ya que afectan a las propiedades de las formulaciones farmacéuticas basadas en este polímero [10].

En los últimos años, el estudio del quitosano se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos [19]. Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficiencia del quitosano en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación *in vivo*. En general, se ha visto que la eficiencia de la absorción de macromoléculas en mucosas utilizando nanopartículas de quitosano como vehículo de encapsulación es inferior a la obtenida con formulaciones de quitosano en solución o en polvo [20].

4 Microesferas y nanopartículas de quitosano

El uso de sistemas micro y nanoparticulados para la encapsulación de fármacos permite el transporte de éstos al lugar de acción terapéutica, el incremento de su vida media y su liberación controlada en el tiempo. Además, al ser partículas pequeñas, presentan una relación superficie-volumen alta [21].

La liberación de un principio activo a partir de sistemas particulados a base de quitosano depende de la densidad de la matriz polimérica. Así, mediante la variación de la concentración y del peso molecular del polímero e incorporando copolímeros y agentes entrecruzantes se pueden obtener sistemas de encapsulación con los perfiles de liberación adecuados en cada caso.

Las microesferas son sistemas homogéneos en los que el fármaco está disperso en una matriz polimérica, a diferencia de las microcápsulas, en las que el principio activo se encuentra rodeado por una capa de polímero.

Las microesferas de quitosano constituyen uno de los sistemas de liberación controlada de fármacos más estudiados, tanto para su administración parenteral como por vía oral. Además de controlar la liberación de principios activos, mejoran la biodisponibilidad de sustancias degradables como las proteínas y promueven la absorción de fármacos hidrosolubles a través de las membranas epiteliales.

Existen varios métodos para la obtención de microesferas, como son [22]:

- Gelificación ionotrópica
- Precipitación
- Atomización o spray-drying
- Coacervación simple
- Coacervación compleja
- Entrecruzamiento químico
- Entrecruzamiento térmico
- Emulsión

La atomización o spray-drying es un proceso de evaporación de solvente que se ha empleado extensamente en la industria farmacéutica para producir polvos secos, gránulos y aglomerados a partir de soluciones y suspensiones. Esta técnica se puede utilizar tanto para fármacos resistentes al calor como para fármacos sensibles, para fármacos solubles o insolubles en agua y para polímeros hidrofílicos o hidrofóbicos [23]. Se trata de un proceso de una sola etapa que se puede escalar fácilmente, es de bajo coste, produce partículas de pequeño tamaño y permite reformular las partículas en forma de suspensiones, cápsulas o comprimidos [24]. Las microesferas obtenidas tienen un tamaño de una micra a varias decenas de micras y son adecuadas para su administración por las vías oral, nasal o parenteral [25-28]. Los parámetros del proceso de atomización, como son el tipo de aguja, la velocidad de la bomba y el flujo de air comprimido, permiten modular el tamaño de partícula.

Las nanopartículas han suscitado un gran interés en los últimos años como sistemas de liberación de fármacos, sobre todo para vías de administración alternativas a la oral, como aquellas que requieren inyección o deposición en superficies mucosas como la nasal. Las nanopartículas se definen como aquellas partículas cuyo tamaño es inferior a 1 μm [29].

Ohya *et al.* (1994) [30] presentaron los primeros resultados de nanopartículas de quitosano para aplicaciones en liberación de fármacos. Obtuvieron nanopartículas cargadas con 5-fluoroacilo por emulsión (w/o) y entrecruzadas con glutaraldehído. Este

agente entrecruzante es tóxico, por lo que no es adecuado para la encapsulación de fármacos.

Posteriormente, Calvo *et al.* (1997) [31] describieron la preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación ionotrópica del quitosano y el tripolifosfato sódico (de ahora en adelante TPP), nanopartículas biodegradables y biocompatibles preparadas por un proceso más suave, sin altas temperaturas ni solventes orgánicos.

Las nanopartículas de quitosano y TPP presentan una serie de interesantes características que las hacen ser vehículos prometedores para la liberación de macromoléculas, tales como proteínas y ADN. Algunas de estas propiedades son: su obtención por un proceso suave, su tamaño ajustable dependiendo de los parámetros de obtención y la modulación de su carga positiva y su capacidad de asociación a péptidos, proteínas, oligonucleótidos y plásmidos [16, 32].

La gelificación iónica entre el quitosano y el TPP ha sido utilizada en diversos estudios. Por ejemplo, Urrusuno *et al.* (1999) [33] estudiaron el efecto de nanopartículas de quitosano y TPP cargadas con insulina sobre la absorción de insulina en conejos. Observaron que las nanopartículas liberaron el fármaco en su forma activa y que promovieron su absorción. También se ha estudiado en ratones el efecto sobre los niveles de inmunoglobulina G en suero e inmunoglobulina A en mucosa de formulaciones preparadas por este método con el toxoide del tétanos, propiciando su aumento tras la administración nasal [34]. Pan *et al.* (2002) [35] estudiaron la capacidad de nanopartículas de quitosano-TPP para promover la absorción intestinal y la biodisponibilidad farmacológica de insulina tras su administración oral. Las nanopartículas así formadas mejoraron la absorción de insulina en relación con una solución de quitosano.

El tamaño de las nanopartículas es uno de los factores que más afectan y determinan la internalización de las mismas en mucosas y tejidos epiteliales y su transporte dentro de las células. La carga superficial de las nanopartículas determina sus propiedades mucoadhesivas y se ha descrito en la bibliografía que la habilidad de las nanopartículas para escapar a la acción de los endolisosomas y liberar el principio activo depende así mismo de dicha carga superficial [32]. Ambas características pueden ser controladas variando ciertas condiciones y variables del proceso de obtención, como la concentración de quitosano, la proporción quitosano: TPP y el pH de la solución. La

proporción de quitosano:TPP es, además, la responsable de la formación de las nanopartículas [36].

5 Películas de quitosano

El carácter filmogénico del quitosano dio lugar a una de las primeras aplicaciones investigadas de este polímero natural. Es posible formar películas de quitosano con buenas propiedades físicas y mecánicas a partir de sus disoluciones en ácidos diluidos [37], tales como fórmico, acético o propiónico [38]. Las propiedades filmogénicas del quitosano se deben a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A pH ácido estos enlaces de hidrógeno se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento de la película.

Muzzarelli planteó por primera vez en 1974 dos metodologías generales de trabajo para obtener películas de quitosano; la primera es mediante la evaporación del ácido empleado en la solución de quitosano (método de evaporación de solvente), y la segunda se basa en la preparación directa de quitosano a partir de la película quitinosa de la jibia (molusco cefalópodo). Este último método [39] no resultó eficiente, pues las propiedades mecánicas de las películas obtenidas no fueron las idóneas, por lo cual no es utilizado en la actualidad.

Las posibles aplicaciones de las películas de quitosano se extienden a la medicina, la industria fotográfica, la alimentación y la cosmética [40, 41]. En el campo de la farmacia, las películas de quitosano se han empleado para el recubrimiento de comprimidos [42] y como sistemas de liberación controlada de fármacos [43].

El uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas cutáneas presenta un gran interés puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y sostenida en el sitio de acción. Se trata de un sistema ventajoso con respecto al uso de cremas, ya que éstas deben ser aplicadas continuamente y son eliminadas con facilidad. Se ha descrito en la bibliografía el uso de películas de quitosano para el vendaje de heridas cutáneas y películas con minociclina para el tratamiento de quemaduras en ratas [44]. Las películas de quitosano resultan efectivas porque protegen la herida, absorben el exudado, tienen acción antibacteriana [45, 46] y favorecen la cicatrización de heridas al estimular la proliferación de fibroblastos [47, 48]. Por otro lado, también se han realizado estudios de citotoxicidad del quitosano en células cutáneas como

queratinocitos y fibroblastos, estudios importantes para este tipo de aplicación, y se ha comprobado que no presenta citotoxicidad *in vitro* [49].

El carácter hemostático del quitosano ha promovido su utilización en parches y vendajes hemostáticos [50]. Prueba de ellos es la comercialización de varios productos de este tipo a base de quitosano por parte de la empresa HemCon Medical Technologies INC (Oregon, EEUU).

5.1 Hinchamiento de las películas de quitosano

La hidratación de los polímeros es uno de los factores que influyen en la liberación de principios activos a través de matrices poliméricas. La hidrofiliidad en los polímeros está dada por el grado de hinchamiento, el cual se calcula a partir de la relación entre el volumen de gel hinchado y el volumen de gel seco. Durante el proceso de hinchamiento se produce la incorporación del líquido en el interior de la matriz, producto de la diferencia de potencial químico del disolvente dentro y fuera de ella, provocando una dilatación de la misma. Al proceso de dilatación se opone una fuerza elástica-retráctil, la cual se opone a la penetración del solvente [51]. El equilibrio de hinchamiento se alcanza cuando se igualan la fuerza de hinchamiento y la fuerza elástica-retráctil.

En los hidrogeles iónicos, la presencia de grupos cargados confiere características únicas al hinchamiento. Dichas características dependen del pH y la fuerza iónica del medio. Peppas y Khare [52] determinaron como factores clave que afectan el hinchamiento:

- Grado de ionización.
- Equilibrio de ionización.
- Naturaleza de los contraiones.

El modelo más común para estudiar la difusión es el propuesto en las leyes de Fick. En la primera ley se define que, en estado de equilibrio, el flujo del penetrante es proporcional al gradiente de concentración [51]:

$$J = - D (dc/dx) \quad (I.1)$$

donde J representa el número de moléculas de sustancia por segundo y por unidad de superficie perpendicular a la dirección de flujo, D es el coeficiente de difusión, y dc/dx es el gradiente de concentración.

Existen otros modelos de cinéticas que describen el comportamiento del hinchamiento en los polímeros. Un ejemplo de los mismos es el planteado por Schott [53], donde se estudia la cinética de hinchamiento en películas de gelatina y celulosa. El autor llega a una ecuación empírica que ajusta los valores obtenidos para todo el proceso de hinchamiento. Dicha ecuación es:

$$\frac{t}{W} = A + Bt \quad (\text{I.2})$$

donde W representa el hinchamiento a un tiempo t , A es la ordenada en el origen y B es el inverso del hinchamiento máximo. El hinchamiento se calcula por la ecuación [54]:

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \quad (\text{I.3})$$

donde M es el peso de la película a un tiempo t y M_0 es el peso de la película antes del proceso de hinchamiento.

Para tiempos grandes $Bt \gg A$, la pendiente B se define como el inverso del hinchamiento máximo $\left(\frac{1}{W_\infty}\right)$, mientras que para tiempos cortos Bt se puede despreciar y

en este caso A es el recíproco de la velocidad inicial de hinchamiento $A = \frac{1}{\left(\frac{dW}{dt}\right)_0}$.

A diferencia del comportamiento Fickiano, en que el hinchamiento está controlado por la difusión, en el modelo de Schott el hinchamiento esta controlado por la relajación de las cadenas.

Al representar los valores de $\frac{t}{W}$ en función de t , Schott demostró que el proceso de hinchamiento de estos materiales respondía a una cinética de segundo orden respecto al hinchamiento remanente, representada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dW}{dt} = K (W_\infty - W)^2 \quad (\text{I.4})$$

donde W_∞ es el hinchamiento a tiempo infinito, W el hinchamiento a tiempo t y K la constante del sistema. El proceso completo de transporte en una matriz polimérica depende principalmente de dos factores, los cuales están gobernados por una amplia variedad de elementos relacionados con la composición y las condiciones

experimentales. Uno de ellos es la movilidad segmental de las cadenas poliméricas y el otro está relacionado con la estructura y morfología del polímero. En cuanto al primer factor, el movimiento difusivo depende de la movilidad relativa de las moléculas del penetrante y de los segmentos de la cadena polimérica, su tamaño, concentración, la interacción de los componentes, la temperatura y otros factores que afectan la movilidad segmental del polímero[51]. La estructura de la red polimérica es un parámetro determinante cuando se describe el transporte a través de las películas, ya que la magnitud del espacio entre las cadenas poliméricas va a determinar cómo se produce dicho transporte.

6 El quitosano como promotor de la absorción de fármacos

El uso de promotores de absorción de fármacos en las formulaciones farmacéuticas está siendo objeto de estudio actualmente para mejorar la liberación de fármacos a través de las mucosas. Los promotores empleados suelen ser polímeros multifuncionales con propiedades mucoadhesivas, capaces de abrir transitoriamente las uniones intercelulares en el epitelio, que no muestren toxicidad y que no se absorban, siendo el quitosano uno de los polímeros más estudiados [55].

Illum *et al.* (1994) [27] estudiaron el efecto de una solución de quitosano de alto peso molecular sobre el transporte de insulina a través de la mucosa nasal en ratas y ovejas. Sus resultados fueron prometedores y desde entonces se han realizado muchos estudios sobre el potencial del quitosano para mejorar la absorción de fármacos peptídicos a través de las mucosas. Por otro lado también se ha estudiado la administración nasal de antígenos en soluciones de quitosano y quitosano en polvo y se ha visto que promueven la respuesta inmune del organismo. Illum *et al.* (2001) [56] evaluaron en humanos una vacuna nasal de la gripe basada en una solución de quitosano. Más del 70% de los voluntarios presentaron niveles protectores tras la administración intranasal.

El efecto positivo del quitosano sobre la liberación de fármacos a través de los epitelios se debe a una combinación entre sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para abrir las uniones estrechas (del inglés “tight junctions”) entre células epiteliales, facilitando así el transporte de fármacos, sobre todo fármacos macromoleculares, a través del epitelio.

Mucoadhesión

La mucoadhesión aumenta el tiempo de permanencia y el contacto entre la membrana y la formulación, lo cual permite una liberación del principio activo de forma sostenida en el tiempo, reduciendo así la necesidad de varias dosis. Se ha descrito en la bibliografía que la administración de principios activos combinados con el quitosano prolonga el tiempo de contacto entre el fármaco y la superficie de absorción de las mucosas en general [57].

Las propiedades mucoadhesivas del quitosano se deben a la interacción entre sus grupos amino protonados y la capa de mucus. Éste está compuesto por una glicoproteína, la mucina, que tiene cargas negativas debido a la presencia de residuos de ácido siálico. La unión depende de la cantidad de ácido siálico presente en la mucina y del grado de desacetilación del quitosano o grupos amino libres. He *et al.* (1998) [58] estudiaron la mucoadhesión de microesferas de quitosano en epitelio intestinal de rata y vieron que ésta aumentó con el número de grupos amino libres debido a los monómeros de glucosamina del quitosano. EL pH también influye en las propiedades mucoadhesivas del quitosano ya que a pH ácido el quitosano se encuentra cargado positivamente (pKa 6,5). También se ha descrito que los quitosanos con cadenas poliméricas más largas penetran más en la capa de mucina, por lo que un alto peso molecular del quitosano también puede favorecer la mucoadhesión [59, 60]. En definitiva, un quitosano de peso molecular alto y grado de desacetilación alto favorece la mucoadhesión.

Apertura de uniones estrechas entre células epiteliales

Los epitelios actúan como barreras que separan al organismo del medio externo, de forma que incluso el movimiento de iones a través del epitelio está retringido, dando lugar a diferencias de potencial eléctrico. Las moléculas pueden atravesar el epitelio de varias formas:

- Por transporte pasivo o difusión, que se produce a favor de gradiente de concentración o gradiente de carga eléctrica y que, por lo tanto, no supone un gasto de energía para las células. La difusión pasiva puede producirse a través de la membrana celular (transporte transcelular) o entre células adyacentes (transporte paracelular).

- Por transporte activo, mecanismo que permite a la célula transportar sustancias a través de su membrana desde regiones menos concentradas a otras más concentradas. Es un proceso que requiere energía.

Las moléculas lipofílicas atraviesan fácilmente la membrana celular por difusión pasiva. Sin embargo, las moléculas hidrofílicas no pueden atravesar la membrana hidrofóbica, por lo que tienen que atravesar el epitelio por la vía paracelular. Esta vía está restringida por la presencia de las uniones estrechas, estructuras multiproteicas dinámicas y complejas que constituyen una barrera semipermeable, que restringe la difusión dependiendo de la carga y el tamaño del soluto. En el epitelio, las uniones estrechas se encuentran en la membrana plasmática en células adyacentes (Figura I.2) y forman una estructura continua que rodea a las células completamente. Las uniones estrechas del epitelio forman una barrera funcional y morfológica entre las superficies apical y basolateral de las células y regulan la difusión a través de la vía paracelular[61].

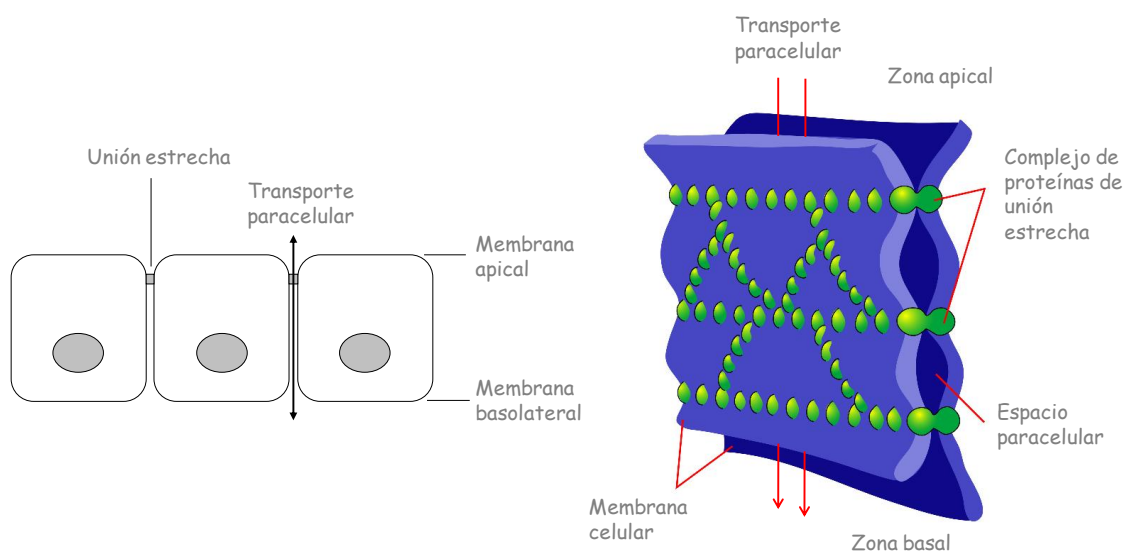


Figura I.2. Representación esquemática de las uniones estrechas entre células epiteliales y el transporte paracelular.

La unión estrecha está formada por un grupo de proteínas transmembrana y citosólicas que no sólo interactúan entre ellas, sino también con la membrana celular y el citoesqueleto de actina, de modo que forman un sistema que une a los componentes de las uniones estrechas con el citoesqueleto. Existen varios tipos de proteínas distintas dentro del grupo que forma parte de las uniones estrechas[61]:

La ocludina es una de las proteínas integrales de membrana que forma parte de las uniones estrechas. Por un lado proporciona la integridad estructural de la unión y por otro regula su función de barrera. Hay estudios que asocian las ocludinas a la regulación de la difusión de pequeños marcadores hidrofílicos, por lo que están implicadas en la regulación de la dinámica de las uniones.

Las claudinas son las principales responsables del ensamblaje de las bandas formadas por las uniones estrechas y de la formación de rutas selectivas de difusión paracelular de iones, ya que diferentes proteínas de la familia de las claudinas permiten el paso de distintos tipos de iones.

Se conocen tres proteínas citosólicas, ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (del latín “Zónula occludens”, que significa unión estrecha), denominadas proteínas asociadas a uniones estrechas, que interactúan entre ellas y ponen en contacto la unión estrecha con el citoesqueleto. Además se ha descrito que regulan la función de la unión estrecha junto con la ocludina. El estado de fosforilación de estas proteínas reguladoras se ha asociado con diferencias en la permeabilidad en modelos *in vitro*. Las mismas rutas de señalización cuyo efecto final es la fosforilación de dichas proteínas pueden también afectar al citoesqueleto de actina, asociado a la membrana plasmática por un grupo de filamentos de actina situado debajo de la unión estrecha y por un anillo de filamentos a nivel de la unión de adhesión que también contiene miosina II. La disrupción del citoesqueleto está asociada con la apertura de las uniones estrechas y, por tanto, al aumento de la permeabilidad paracelular [62].

Smith *et al.* (2005) [63] describieron que la habilidad del quitosano en solución y en forma de nanopartículas para modular las uniones estrechas se puede explicar por las posibles interacciones del quitosano con receptores específicos de la superficie celular que conlleva la activación de la transducción de señales dependiente de la proteína quinasa C (PKC). La activación de la PKC además induce la pérdida de asociación de las proteínas de las uniones estrechas, la ZO-1 y la ocludina, en la membrana plasmática y, por tanto, la pérdida de las uniones estrechas. Ranaldi *et al.* (2002) [64] también demostraron que el tratamiento con quitosano alteraba la distribución de F-actina en células Caco-2.

7 Cultivos celulares como modelo epitelial

Los estudios con cultivos de células epiteliales permiten una fácil evaluación de las propiedades de las uniones entre células y constituyen un método muy utilizado en experimentos de transporte de principios activos a través de monocapas celulares.

Para llevar a cabo este tipo de experimentos, las células epiteliales se suelen sembrar en soportes permeables (transwells) (Figura I.3), que están constituidos por una membrana y una cámara basal y otra apical. Sobre estos soportes, las células sembradas forman monocapas.

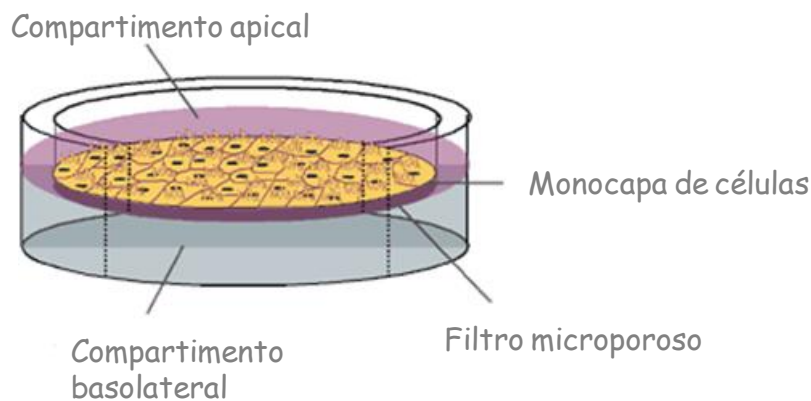


Figura I.3. Esquema de una monocapa celular en un soporte permeable.

Se realizan dos tipos de estudios en relación con las uniones estrechas: la medida de corrientes eléctricas y el estudio del flujo de compuestos marcados a través de las monocapas. Como se ha comentado en el apartado anterior, las uniones estrechas limitan la difusión paracelular de moléculas hidrofílicas de forma selectiva, por carga y tamaño. Cuando el movimiento de iones a través de la monocapa está restringido debido al correcto funcionamiento de la unión estrecha, existe un gradiente de potencial eléctrico a ambos lados de la misma. Por ello, la integridad y la madurez de las uniones estrechas se suele determinar midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), que es inversamente proporcional a la permeabilidad, empleando para ello un voltímetro cuyos electrodos pueden aplicarse directamente sobre los soportes permeables. Este estudio se realiza en medio de cultivo, por lo que refleja principalmente la permeabilidad al sodio.

Las medidas de TEER se suelen realizar para hacer un seguimiento del crecimiento celular tras la siembra, ya que su valor aumenta a medida que se va formando la monocapa de células. Así mismo, se realizan medidas de TEER durante los

experimentos de permeabilidad de sustancias problema para observar cualquier cambio en la integridad de la monocapa. Los experimentos de permeabilidad paracelular se llevan a cabo con compuestos marcados con fluorescencia como dextranos, o bien con proteínas que se pueden cuantificar con ensayos enzimáticos. De esta forma es posible cuantificar la cantidad de compuesto que pasa de la parte apical a la basal en un período de tiempo concreto. Se pueden emplear marcadores de distintos pesos moleculares para evaluar la eficiencia de un determinado promotor de permeabilidad celular.

Existen distintas líneas de células epiteliales que se utilizan como modelos para experimentos de permeabilidad y de evaluación de la apertura de uniones estrechas.

Células Calu-3

Los modelos celulares *in vitro* son muy utilizados con el fin de estudiar la deposición y absorción de fármacos tras su administración por la vía respiratoria, aunque existen otros métodos como son estudios con modelos de perfusión en pulmón aislado y análisis fármaco-cinéticos *in vivo*.

La línea celular Calu-3 procede de adenocarcinoma de pulmón humano y se utiliza como modelo del epitelio de las vías respiratorias [65]. El lumen y el tejido submucoso de los conductos respiratorios constituyen el lugar de acción de una gran cantidad de fármacos, pero también constituye una barrera frente a la absorción de dichos fármacos. Por tanto, el epitelio respiratorio es una membrana clave a estudiar, tanto por ser una barrera para el transporte de fármacos, como por ser un lugar donde los fármacos pueden ejercer su toxicidad. El epitelio varía entre un epitelio pseudo-estratificado en columnas, con tres tipos principales de células (ciliadas, basales y secretoras) interconectadas por uniones estrechas en los bronquios proximales, hasta un epitelio progresivamente más cuboidal, no ciliado y localizado en los bronquiolos distales [65]. Una característica importante del epitelio respiratorio es su diferenciación en capas de células interconectadas por uniones estrechas intercelulares, que limitan el transporte paracelular de solutos, por lo que afecta a la absorción y el metabolismo de fármacos. Otras características propias de este epitelio incluyen la producción de mucus, la presencia de cilios apicales y la expresión de transportadores y sistemas metabólicos. Se ha demostrado en varios estudios que algunas de estas características están presentes en las células Calu-3, lo que sugiere la utilidad de esta línea celular como modelo del epitelio respiratorio [66, 67].

Las condiciones de cultivo tienen un efecto importante sobre la diferenciación de las células epiteliales respiratorias y deben ser optimizadas para cada modelo celular individualmente. Se han descrito tanto cultivos sumergidos como cultivos con una interfase aire-líquido para células Calu-3 [68, 69]. La formación de cilios está influenciada por el método de incubación, siendo más cortos y gruesos en cultivos sumergidos[70].

Uno de los primeros trabajos sobre transporte de fármacos en células Calu-3 fue realizado por Cavet *et al.* (1997) [71]. Estudiaron el transporte de ciprofloxacino a través de monocapas constituidas por estas células y observaron que el antibiótico era transportado principalmente por vía transcelular por difusión pasiva. Este resultado concidió con los resultados de estudios fármaco-cinéticos en humanos.

8 Agentes entrecruzantes

Los sistemas de liberación a base polímeros biodegradables necesitan ser entrecruzados para modular sus propiedades y mantener la estabilidad de la matriz y así cumplir el objetivo de liberar el fármaco a lo largo del tiempo deseado. El quitosano, como se ha comentado, se disuelve en condiciones ácidas, lo que limita su aplicación como sistema de liberación. El entrecruzamiento puede reducir la solubilidad del quitosano en solventes acuosos, aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y ayudar a controlar la liberación de principios activos desde la matriz formada. El glutaraldehído es un agente entrecruzante muy utilizado, pero su capacidad de transformación en especies reactivas tóxicas ha promovido la búsqueda de otros agentes y procedimientos de entrecruzamiento más seguros, como son el tripolifosfato sódico y la genipina [72].

Tripolifosfato sódico

El tripolifosfato sódico (TPP) es un agente entrecruzante no tóxico (reconocido como GRAS por la FDA) que es capaz de formar geles al unirse con el quitosano por interacción iónica.

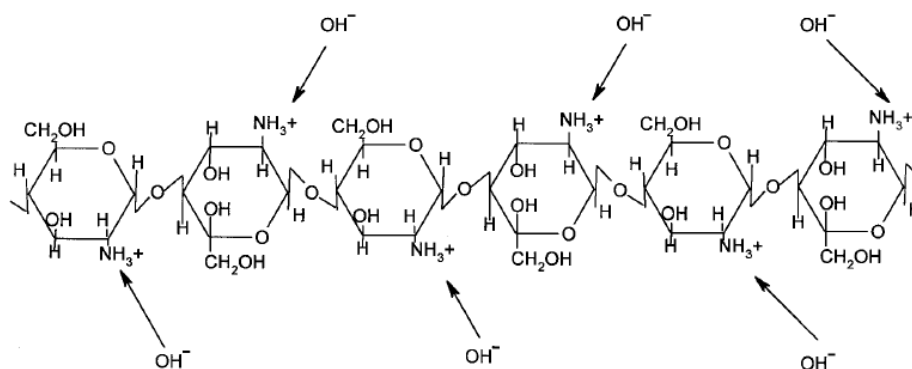
Desde que Bodmeier *et al.* (1989) [73] describiesen la preparación de complejos quitosano/TPP, la formación de complejos entre estas moléculas con cargas opuestas para obtener formulaciones que controlan la liberación de fármacos ha ganado interés puesto que se trata de un proceso muy simple. Concretamente, la formulación de micro

y nanopartículas por interacción iónica entre el quitosano y el tripolifosfato sódico es muy común porque implica la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente sin el uso de solventes orgánicos.

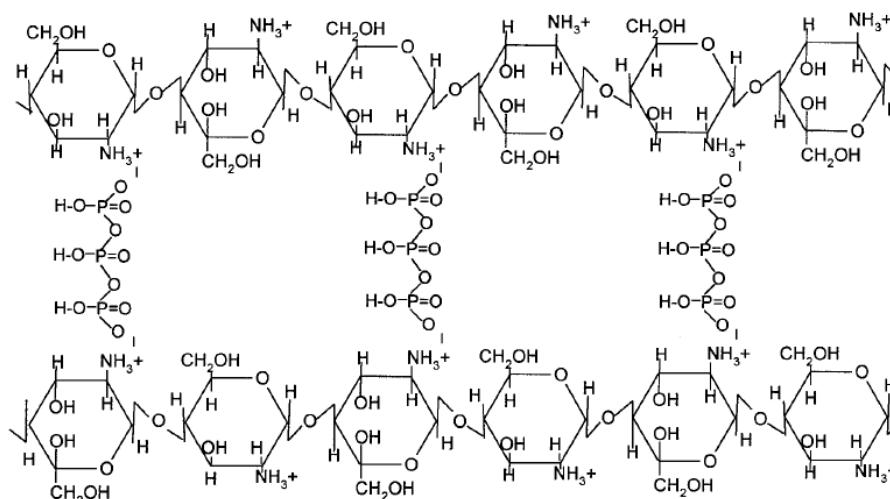
La reacción que se produce entre el quitosano y el TPP ha sido descrita en la bibliografía [74, 75]. El TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) disuelto en agua se disocia en iones tripolifosfóricos y en OH^- y la solución resultante tiene pH 9. Los pK_a del TPP son: $\text{pK}_1=1$, $\text{pK}_2=2$, $\text{pK}_3=2,79$, $\text{pK}_4=6,47$ y $\text{pK}_5=9,24$ [76]. Los aniones procedentes del TPP ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ y $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$) coexisten en solución acuosa en función del pH. Dependiendo del valor de éste, predominarán unos u otros y de ello dependerá el tipo de interacción que ocurra entre el TPP y el quitosano. Cuando el TPP se disuelve en agua, con pH 9, se disocia en iones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ y, éste a su vez en $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ y en iones OH^- . Al añadir la solución de este agente entrecruzante (pH 9) a una solución de quitosano (pH ácido), los iones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ y $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ compiten con los OH^- por reaccionar con los grupos NH_3^+ del quitosano por entrecruzamiento iónico, en el caso de los iones tripolifosfóricos o por desprotonación, en el caso de los OH^- (Figura I.4).

A pH 9 de la disolución de TPP, por tanto, habrá grupos amino neutralizados por los grupos hidroxilo y grupos amino entrecruzados iónicamente.

Sin embargo, si el pH del TPP es ajustado a un pH ácido, sólo existirán iones tripolifosfóricos. El tipo de iones tripolifosfóricos y su proporción vendrán dados por el pH de la solución. En este caso, el complejo quitosano-TPP se forma exclusivamente por entrecruzamiento iónico entre los grupos NH_3^+ y los aniones de TPP.



a) neutralización de los grupos amino



b) entrecruzamiento iónico

Figura I.4. Esquema de la reacción entre el quitosano en solución ácida y los iones de TPP: A- neutralización de los grupos amino, B- entrecruzamiento iónico[75].

Genipina

La genipina (Figura I.5) es un compuesto de origen natural que se obtiene a partir del genipósido procedente del fruto de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides*. Estos frutos tienen propiedades antiinflamatorias, diuréticas, coleréticas y hemostáticas[77]. Una propiedad destacable de la genipina es su capacidad de reaccionar espontáneamente con aminas primarias, dando lugar a pigmentos azules. Se ha descrito su reacción con materiales que contienen grupos amino, como el quitosano y algunos péptidos y proteínas, dando lugar a estructuras entrecruzadas químicamente. Dicha propiedad permite su utilización como agente entrecruzante en sistemas de liberación de fármacos.

Se ha comprobado que la genipina presenta una toxicidad 5000-10000 veces más baja con respecto al glutaraldehído[78].

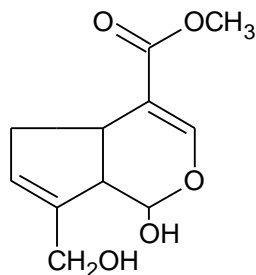


Figura I.5. Estructura química de la genipina.

Durante la reacción de entrecruzamiento entre la genipina y el quitosano se producen dos reacciones separadas. La primera reacción consiste en un ataque nucleofílico por parte de los grupos amino del quitosano sobre el carbono 3 de la genipina, que da lugar a la formación de un compuesto heterocíclico de la genipina unida al residuo de glucosamina en el quitosano. La segunda reacción, más lenta, consiste en una sustitución nucleofílica del grupo ester de la genipina, liberando metanol y formándose un enlace amida con el quitosano. En la Figura I.6 se muestra un esquema del entrecruzamiento del quitosano con genipina. Simultáneamente, se puede producir una polimerización entre moléculas de genipina que ya están unidas a los grupos amino del quitosano, lo cual puede dar lugar al entrecruzamiento del quitosano a través de copolímeros de genipina [77].

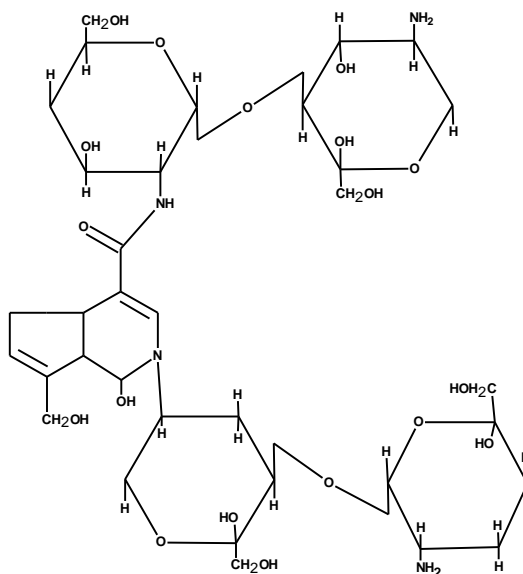


Figura I.6. Esquema del entrecruzamiento del quitosano con la genipina.

La genipina ha sido utilizada en la obtención de diversos sistemas de liberación de fármacos tales como microcápsulas e hidrogeles. Mi *et al.* prepararon complejos polielectrolitos con la membrana formada por alginato y quitosano y el interior de la cápsula compuesto por quitosano entrecruzado con genipina [79], así como cápsulas de quitosano entrecruzadas simultáneamente por entrecruzamiento iónico con TPP y químico con genipina[80]. Barck & Butler (2005) emplearon distintos polímeros polianiónicos, entre ellos el alginato, para formar complejos polielectrolitos con quitosano y entrecruzados con genipina[81]. Por otro lado, microcápsulas de alginato-quitosano con el interior compuesto de alginato y la membrana de quitosano con genipina fueron preparadas por Chen *et al.* (2006) para la encapsulación de células vivas y otras aplicaciones en liberación [82]. Hidrogeles de quitosano entrecruzados con genipina han sido preparados y caracterizados en diversos trabajos [83, 84]. Sólo se han descrito en la bibliografía algunos estudios sobre la preparación, caracterización y liberación *in vitro* de fármacos a partir de microesferas de quitosano entrecruzadas con genipina. Mi *et al.* (2001) prepararon microesferas de quitosano por un método de dispersión agua en aceite, utilizando genipina como agente entrecruzante[85]. Yuan *et al.* (2007) obtuvieron microesferas de quitosano, albúmina bovina y genipina[86].

9 **Fármacos empleados**

Claritromicina

La claritromicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos, que ejerce su acción antibacteriana por interferir en la síntesis de proteínas de las bacterias sensibles ligándose a la subunidad ribosomal 50S. Se trata de una sustancia básica de carácter cristalino, de color blanco. Su masa molecular es 747 g/mol. En la Figura I.7 se presenta la estructura molecular de la claritromicina.

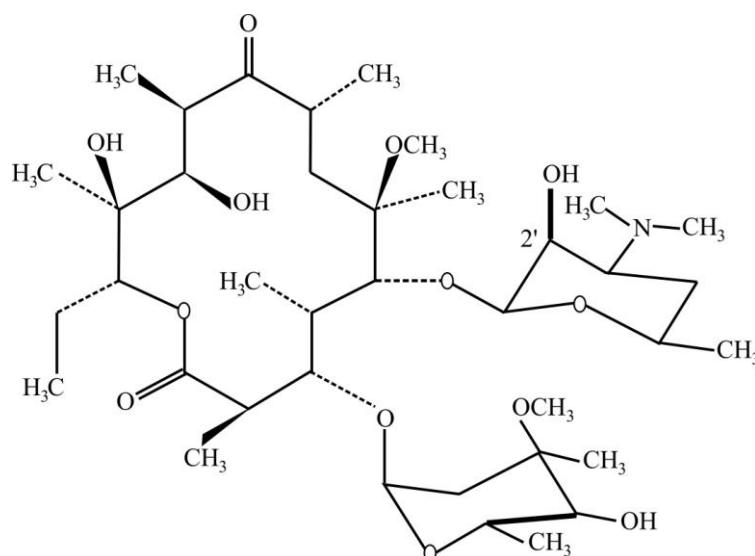


Figura I.7. Estructura molecular de Claritromicina.

La claritromicina es bactericida para *Helicobacter pylori*, presente en la mucosa gástrica de la mayoría de los pacientes con úlcera duodenal o gastritis. La infección por *Helicobacter pylori* se considera uno de los principales factores patogénicos responsables de la úlcera gástrica.

La terapia con antibióticos presenta ciertos inconvenientes, como la necesidad de una dosis frecuente para mantener la concentración de fármaco en plasma al nivel terapéutico, el bajo cumplimiento por parte del paciente, infecciones causadas por microorganismos resistentes y efectos secundarios en el tracto gastrointestinal [87]. La ineficacia descrita en el tratamiento de la infección por *H. pylori* puede ser debida a la baja estabilidad de los antibióticos en el medio ácido del estómago, a la baja absorción a través de la capa de mucus, o a la administración de una dosis sub-terapéutica[60].

La liberación específica de claritromicina en el estómago a través de un sistema de encapsulación basado en quitosano podría ser un tratamiento adecuado frente a *H.pylori*. El quitosano se hincha en medio ácido, es un sistema adecuado para la liberación controlada de fármacos, presenta propiedades antiácidas, disminuye la irritación en el estómago causada por la administración de fármacos[60] y ejerce actividad antibacteriana debido a la unión de los grupos catiónicos del quitosano a las moléculas aniónicas de la superficie externa de la membrana bacteriana [88]. Además, como se ha explicado anteriormente, es bioadhesivo y actúa sobre las uniones estrechas entre células epiteliales, por lo que aumenta el tiempo de residencia en el tejido y promueve la absorción del fármaco a través de las mucosas. Por otro lado, la

microencapsulación de claritromicina en una matriz polimérica la protegería frente a la degradación a pH ácido.

La claritromicina es soluble a pH ácido y su solubilidad disminuye al aumentar el pH, por lo que es más soluble y se absorbe mejor en el estómago que en el intestino.

Se han descrito en la bibliografía otros estudios de encapsulación de claritromicina. Majithiya y Murthy (2005) [60] obtuvieron microesferas de quitosano con claritromicina por emulsificación y entrecruzamiento con glutaraldehído. Zgoulli *et al.* (1999) [24] prepararon microesferas cargadas con eritromicina y claritromicina por atomización para enmascarar su sabor, aumentar la biodisponibilidad de estos antibióticos y mejorar su estabilidad.

Hidrocloruro de tramadol

El hidrocloruro de tramadol (Figura I.8) es un opiáceo sintético del grupo de los aminociclohexanoles (clorhidrato de (\pm) cis-2- [(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol) con acción analgésica a nivel central. El tramadol es un análogo sintético de la codeína, con una menor afinidad que ésta hacia los receptores opiáceos. Su vida media es de 5,5 horas, y la dosis adecuada suele ser de 50-100mg cada 4-6 horas. La fórmula empírica es $C_{16}H_{25}NO_2$ y su masa molecular 263g/mol.

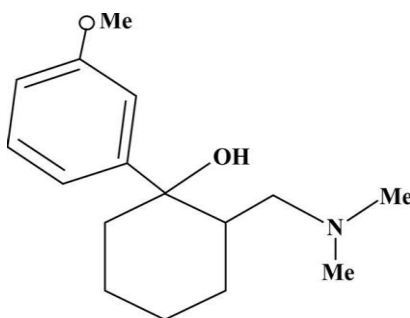


Figura I.8. Estructura molecular del hidrocloruro de tramadol.

El tramadol es un analgésico opiáceo con un mecanismo dual de acción. Es una mezcla racémica de los isómeros trans, observándose importantes diferencias desde el punto de vista bioquímico, farmacológico y metabólico entre ambos enantiómeros. El tramadol tiene un potencial mucho menor que otros opiáceos para inducir depresión respiratoria y dependencia, pero ambos efectos adversos pueden tener lugar. Para disminuir la frecuencia de administración, sería deseable administrarlo a través de una forma farmacéutica de acción retardada.

Hidrocloruro de ciprofloxacino

El hidrocloruro de ciprofloxacino (Figura I.9) es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas. Se utiliza en casos de neumonía, infecciones cutáneas y es uno de los antibióticos más utilizados en oftalmología [89]. Su peso molecular es de 331,35g/mol. Es activo frente a un amplio espectro de bacterias Gram-negativas aerobias, incluyendo patógenos entéricos, *Pseudomonas* y *Serratia marcescens*, aunque ya han empezado a aparecer cepas resistentes. Igualmente es activo frente a bacterias Gram-positivas, aunque también se han detectado resistencias en algunas cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pneumococos*. No es activo frente a microorganismos anaerobios. Se utiliza ocasionalmente, en combinación con otros antibacterianos, en el tratamiento de las infecciones por micobacterias.

Los efectos antibacterianos del hidrocloruro de ciprofloxacino se deben a la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas. Estas topoisomerasas alteran el DNA introduciendo pliegues superhelicoidales en el DNA de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas. La DNA-girasa tiene dos subunidades codificadas por el gen *gyrA*, y actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego pegándolas una vez que se ha formado la superhélice. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano. Las células humanas y de los mamíferos contienen una topoisomerasa que actúa de una forma parecida a la DNA-girasa bacteriana, pero esta enzima no es afectada por las concentraciones bactericidas del hidrocloruro de ciprofloxacino.

Este principio activo puede producir efectos secundarios cuando se administra por vía oral, como dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza, entre otros. Una forma alternativa de administración, como la vía tópica podría minimizar estos efectos secundarios [90].

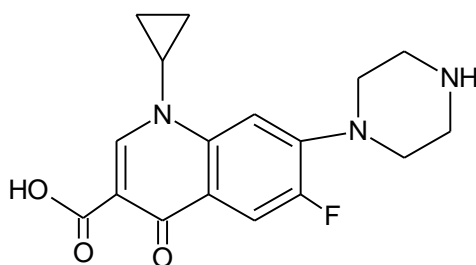


Figura I.9. Estructura molecular del hidrocloruro de ciprofloxacino

10 Modelos matemáticos

Los estudios de disolución/liberación *in vitro* constituyen un eslabón importante dentro de la cadena del desarrollo de un nuevo medicamento. Bajo ciertas condiciones puede servir para aportar criterios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Un objetivo fundamental a la hora de desarrollar nuevos sistemas de liberación controlada, es poder predecir los niveles plasmáticos que alcanzará el fármaco una vez administrado. De esa forma, el desarrollo de los procesos de obtención de nuevos medicamentos puede ser acelerado, de modo que éstos pueden ponerse en el mercado con mayor brevedad y a menor precio. Por este motivo se han desarrollado numerosos modelos matemáticos que permiten predecir las cinéticas de disolución- liberación de los principios activos incluidos en los sistemas de liberación controlada, y por tanto su biodisponibilidad *in vivo*. Estos modelos permiten interpretar los resultados cuantitativos de un ensayo de liberación *in vitro* a través de una ecuación que relaciona varios parámetros [91]. Para comparar diferentes perfiles de liberación se pueden emplear métodos matemáticos (métodos modelo dependiente) y métodos estadísticos (métodos modelo independiente), que incluyen el análisis de la varianza, de una o dos vías (ANOVA).

Los modelos matemáticos facilitan el análisis cuantitativo de los resultados obtenidos en los ensayos de liberación/disolución, y describen los resultados de liberación en función de alguna de las características o variables de la formulación empleada [91].

Cinética de orden cero

Las formas farmacéuticas que presentan esta cinética liberan la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo. Es el mecanismo de liberación ideal cuando se quiere conseguir una acción farmacológica prolongada.

La liberación del fármaco desde formas farmacéuticas que no se disgregan y que liberan el principio activo lentamente (asumiendo que el área no cambia y que no se alcanzan condiciones de equilibrio), puede ser representada por la siguiente ecuación:

$$W_0 - W_t = Kt \quad (I.5)$$

donde W_0 es la cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica, W_t es la cantidad de fármaco presente en la misma a tiempo t y K la constante de proporcionalidad.

Si esta ecuación se divide entre W_0 y se simplifica, se obtiene:

$$f_t = K_0 t \quad (\text{I.6})$$

donde $f_t = 1 - (W_t / W_0)$ y f_t representa la fracción de fármaco liberado a tiempo t y K_0 la constante de liberación aparente o constante de orden cero. De esta forma, una gráfica de la fracción de fármaco liberado en función del tiempo será lineal si se cumplen las condiciones anteriores.

Otra forma de expresar este modelo se refleja en la siguiente ecuación:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (\text{I.7})$$

donde Q_t es la cantidad de fármaco liberado a tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco en solución, que generalmente es cero y K_0 es la constante de velocidad en la cinética de orden cero.

Cinética de primer orden

La aplicación de este modelo al estudio de la liberación de fármacos fue propuesto por primera vez por Gibaldi y Feldman en 1967 [92]. La cinética de orden uno presenta la siguiente ecuación de velocidad:

$$Q_t = Q_0 e^{-K_1 t} \quad (\text{I.8})$$

$$\ln Q_t = -K_1 t + \ln Q_0 \quad (\text{I.9})$$

o en logaritmos decimales:

$$\log Q_t = -(K_1 t / 2,303) + \log Q_0 \quad (\text{I.10})$$

donde Q_t es la cantidad de fármaco liberado a tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco en la solución y K_1 es la constante de primer orden.

De esta forma, la representación del logaritmo de la cantidad de fármaco disuelto frente al tiempo transcurrido da lugar a una recta en los procesos con cinética de primer orden. Las formas farmacéuticas que siguen este perfil de disolución suelen ser matrices porosas que contienen principios activos hidrosolubles.

Modelo de Higuchi

Higuchi (1963) desarrolló varios modelos teóricos para estudiar la liberación de fármacos solubles y poco solubles incorporados en matrices sólidas o semi-sólidas[93].

Este modelo describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión a través de la matriz de polímero, siempre y cuando se mantengan las condiciones “sumidero” (del inglés *sink conditions*), es decir, que se garantice la solubilidad del fármaco en todo momento durante la liberación. Esta difusión está basada en la ley de Fick, que depende de la raíz cuadrada del tiempo. Generalmente se emplea lo que se conoce como ecuación simplificada de Higuchi:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (\text{I.11})$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado y K_H es la constante de disolución de Higuchi.

Modelo de Hixson- Crowell o de la raíz cúbica

Hixson and Crowell (1931) [94], partiendo de la base de que el área regular de la partícula es proporcional a la raíz cúbica de su volumen propusieron la siguiente ecuación para describir este modelo:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \quad (\text{I.12})$$

donde W_0 es la cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica, W_t es la cantidad de fármaco que queda en la forma farmacéutica a tiempo t y K_s es una constante que incorpora la relación superficie-volumen.

Dividiendo la ecuación anterior entre $W_0^{1/3}$ y simplificando:

$$(1 - f_t)^{1/3} = 1 - K_\beta t \quad (\text{I.13})$$

donde $f_t = 1 - (W_t / W_0)$ y representa la fracción de fármaco disuelto a tiempo t y K_β es la constante de liberación.

La gráfica de la raíz cúbica de la fracción de fármaco no liberada en función del tiempo será lineal si la forma farmacéutica disminuye de tamaño proporcionalmente en el tiempo. Cuando se utiliza este modelo, se asume que la velocidad de liberación está condicionada por la velocidad de disolución de las partículas de fármaco y no por la difusión que pueda ocurrir a través de la matriz polimérica.

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer *et al.* (1983) [95] desarrollaron un modelo semiempírico sencillo que relaciona la liberación de fármaco con el tiempo a través de una ecuación exponencial. Estos autores plantearon que, en ocasiones, el mecanismo de difusión se desvía de la

difusión Fickiana, siguiendo un comportamiento anómalo o no Fickiano. Es un modelo especialmente útil cuando se desconoce el mecanismo de liberación o cuando ésta ocurre por más de un mecanismo.

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (\text{I.14})$$

$$\text{Log } M_t/M_\infty = \text{Log } K + n \text{ Log } t \quad (\text{I.15})$$

donde M_t es cantidad de fármaco liberado a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito (por tanto, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t), K es la constante del sistema y n es el exponente difusional. La representación del $\text{Log } M_t/M_\infty$ en función del $\text{Log } t$ dará lugar a una línea recta si el sistema se ajusta a este modelo.

Según los valores que tome n se pueden definir distintos mecanismos de transporte [96]. En la Tabla I.2 se muestran los posibles mecanismos que se pueden observar en la liberación controlada de un principio activo utilizando una película polimérica como sistema regulador. Cuando $n = 0,5$ se trata de una difusión Fickiana y la constante k puede expresarse como:

$$k = 4 \left(\frac{D_i}{\pi \delta^2} \right)^{1/2} \quad (\text{I.16})$$

donde D_i es el coeficiente de difusión del fármaco desde el polímero y δ el espesor de la matriz de polímero.

Valores de $n > 0,5$ se asocian a un mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano). En particular, cuando $n = 1$, se trata de la cinética de orden cero, que Peppas considera un caso límite de transporte no Fickiano, denominándolo “Transporte Caso II”. En este caso, el transporte del soluto se realiza a velocidad constante debido a que el frente de hinchamiento del polímero avanza de forma constante. Este tipo de transporte está controlado por la relajación de las cadenas del polímero.

Cuando $n < 0,5 < 1$, el proceso está dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas. Valores de $n > 1$ aparecen usualmente cuando los tiempos de liberación son muy elevados y a este tipo de transporte lo denominan “Transporte Supercaso II”. Por último, valores de $n < 0,5$ se asocian a la presencia de poros en la matriz polimérica y a la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada y a través de los poros llenos de medio de disolución.

Tabla I.2. Resumen de los mecanismos de transporte de solutos dependiendo del exponente difusional n .

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte del fármaco
0,5	Difusión Fickiana
$0,5 < n < 1$	Transporte anómalo
1	Transporte Caso II
$n > 1$	Transporte Supercaso II

En la Tabla I.3 se muestran los valores del exponente difusional (n) para matrices de liberación con diferentes geometrías y mecanismos de liberación.

Tabla I.3. Valores del exponente difusional en el modelo empírico de Korsmeyer-Peppas para sistemas de distinta geometría.

Geometría de la matriz	Sistema controlado por difusión (Caso I)	Sistema controlado por hinchamiento (Caso II)
<i>Lámina</i>	$n = 0,5$	$n = 1$
<i>Cilindro</i>	$n = 0,45$	$n = 0,89$
<i>Esfera</i>	$n = 0,43$	$n = 0,85$

Cuando el hidrogel está inicialmente hinchado y contiene un fármaco soluble, las ecuaciones que se utilizan en la cinética de liberación son las mostradas en la Tabla I.4, las cuales dependen de la geometría del hidrogel [97].

Tabla I.4. Soluciones aproximadas para la liberación difusional de fármacos a partir de matrices poliméricas [97].

Geometría	Estados iniciales	Estados finales
<i>Películas</i> $r = \text{espesor}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi r^2} \right)^{1/2}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp \left(\frac{-\pi^2 Dt}{r^2} \right)$
<i>Cilindros</i> $r = \text{radio}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi r^2} \right)^{1/2} - \frac{Dt}{r^2}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{4}{\pi^2} \exp \left(\frac{-\pi^2 Dt}{r^2} \right)$
<i>Esferas</i> $r = \text{radio}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \left(\frac{Dt}{\pi r^2} \right)^{1/2} - 3 \frac{Dt}{r^2}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \exp \left(\frac{-\pi^2 Dt}{r^2} \right)$

Modelo de Baker- Lonsdale

Este modelo fue desarrollado por Baker and Lonsdale (1974) [98] a partir del modelo de Higuchi. Describe la liberación de fármaco desde una matriz esférica y viene dado por la siguiente expresión:

$$f_t = \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (\text{I.17})$$

donde M_t es la cantidad de fármaco liberada a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito (por tanto, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t) y k la constante de liberación y pendiente de la recta.

Esta ecuación se ha empleado para la linealización de perfiles de liberación de microcápsulas y microesferas[99].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Materiales

En este trabajo se han empleado los siguientes reactivos:

Polímeros

- Hidrocloruro de quitosano (HCS) (Protasan[®] UP Cl 113 y 213), suministrado por Novamatrix (Noruega), de 150 y 400 kDa de peso molecular respectivamente y un grado de desacetilación del 86% en ambos casos.
- Quitosano (CS), suministrado por Primex (Islandia), con un peso molecular de 644kDa y un grado de desacetilación del 90%.

Principios activos

- Claritromicina, suministrada por el Laboratorio Farmacéutico Vegal Farmacéutica S.L. (Madrid, España).
- Hidrocloruro de tramadol, suministrado por el Laboratorio Farmacéutico Vegal Farmacéutica S.L. (Madrid, España).
- Hidrocloruro de ciprofloxacino, suministrado por Elfar Drag S.L. (Madrid, España)

Agentes entrecruzantes

- Tripolifosfato sódico (TPP), suministrado por Sigma- Aldrich (España)
- Genipina, suministrada por Challenge Bioproducts Co., Ltd (Taiwan).

Células y reactivos para los ensayos celulares

Las células Calu-3 y el medio de cultivo EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) se obtuvieron de la ATCC (del inglés American Type Culture Collection) – LGC Promochem.

La solución salina equilibrada de Hank (HBSS), el surfactante Triton-X 100 y el kit para el ensayo LDH (lactato deshidrogenasa), comercialmente conocido como TOX7, fueron suministrados por Sigma Chemical Company (Poole, UK). El reactivo para MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazolio), comercialmente conocido como CellTiter 96 AQueous One Solution Assay, fue suministrado por Promega (USA).

2 Obtención de microesferas de hidrocloreuro de quitosano

Se prepararon soluciones de hidrocloreuro de quitosano en agua destilada en diferentes concentraciones según el caso (0,1-1% p/v). A continuación se añadió el fármaco correspondiente, un 30% p/p para las microesferas de tramadol y un 50% p/p para las de claritromicina. Las soluciones resultantes se atomizaron en un Büchi Mini Spray- Dryer B- 290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), representado en la Figura II.1. Se utilizaron las siguientes condiciones: flujo de aire 473 NL h^{-1} , flujo de pulverización $32 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ y temperatura de entrada (inlet) 160°C . Las microesferas resultantes se recogieron del colector y fueron almacenadas en un desecador Pyrex® (Afora S.A., Barcelona, España) a temperatura ambiente.

En el proceso de atomización, el líquido llega a la aguja gracias a la bomba peristáltica y la fuerza del aire comprimido lo separa en gotas, que pasan a una cámara donde es evaporado el solvente. El solvente de las gotas es retirado debido a la energía calorífica producida por el atomizador. Se obtiene una eficiencia óptima de atomización cuando existe un equilibrio entre la energía de entrada y la cantidad de energía necesaria, que depende de la muestra que se atomice. Puesto que el punto de ebullición del agua es 100°C , la temperatura de entrada del atomizador debe ser mayor. Se ha descrito en la bibliografía que la temperatura de entrada óptima para la preparación de microesferas a partir de soluciones de quitosano es de 160°C . A temperaturas inferiores o velocidades de flujo altas, el solvente de las gotículas no se evapora completamente [25-28].

En el caso de las microesferas entrecruzadas, antes del proceso de atomización, se añadió además el agente entrecruzante correspondiente. Para las microesferas con claritromicina se empleó TPP o genipina. Se utilizaron dos concentraciones de TPP (0,1 y 0,2% p/v) en una proporción de volumen 10:3 y a valores de pH 4 y 9. La genipina se añadió en una concentración de 0,5 (0,02% p/v) y 1mM (0,04% p/v). Las soluciones de hidrocloreuro de quitosano 0,5 y 1% (p/v) entrecruzadas con TPP a pH 9 no se pudieron atomizar puesto que se formaron agregados al añadir el TPP.

Las microesferas con hidrocloreuro de tramadol fueron sometidas a un entrecruzamiento con varias concentraciones de genipina (2-20mM), para lo cual se añadió la solución de genipina y se sometió la mezcla resultante a dos tiempos de entrecruzamiento (5 y 15 horas) a 50°C .



Figura II.1. Atomizador Büchi Mini Spray- Dryer B- 290.

El rendimiento de atomización (RA) se calculó a partir de la cantidad total de sólidos iniciales en la solución.

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) de las microesferas de tramadol y claritromicina obtenidas por atomización, se tomaron 5mg de microesferas y se disolvieron en 20mL de HCl 0,1N durante 24 horas. De ahí se tomó una alícuota que se centrifugó a 20000rpm (Mikro 12-24, Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Alemania) y se determinó la cantidad de fármaco presente por espectrofotometría UV-VIS (GBC UV-VIS 920) en el caso del tramadol, y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el caso de la claritromicina. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

3 Obtención de películas de quitosano

Las películas de quitosano cargadas con hidrocloreto de ciprofloxacino se obtuvieron por el método de evaporación del solvente. Se disolvió el quitosano al 3% (p/v) en ácido acético 1% (v/v) y se añadió el fármaco en un 30% (p/p) respecto al polímero. Se vertió una cantidad determinada de la solución en una placa Petri modelo y se dejó secar a 37°C durante 48 horas. El entrecruzamiento entre el quitosano y el agente entrecruzante se llevó a cabo por inmersión de las películas en soluciones acuosas de TPP (100mL) a 4°C a diferentes concentraciones (0, 1, 2,5 y 5% p/v) y tiempos de entrecruzamiento (0, 0,5, 1 y 4 horas). Finalmente se extrajo la película de la solución de TPP y se secó en estufa a 37°C, durante 24 horas.

La EE del hidrocloreto de ciprofloxacino se determinó midiendo por espectrofotometría UV-VIS la cantidad de fármaco que quedó en las soluciones de TPP tras la reacción de entrecruzamiento. La EE se calculó utilizando la siguiente expresión.

$$EE (\%) = [(Q_{total} - Q) / Q_{total}] \cdot 100 \quad (II.1)$$

donde Q_{total} es la cantidad teóricamente encapsulada de fármaco y Q la cantidad de fármaco detectada en la solución de TPP tras el entrecruzamiento.

4 Obtención de nanopartículas de hidrocloreuro de quitosano

Las nanopartículas se prepararon por gelificación ionotrópica del TPP y el hidrocloreuro de quitosano con modificaciones del método propuesto por Fernandez-Urrusuno *et al.* [33]. Inicialmente se determinó la concentración adecuada de hidrocloreuro de quitosano y TPP para la formación de las nanopartículas. Para ello, se gotearon 1,8mL de una solución de TPP 0,084% (p/v) sobre soluciones de 4mL de hidrocloreuro de quitosano de diferentes concentraciones (0,05-0,2% p/v) en agua destilada, con agitación. Las suspensiones resultantes se caracterizaron visualmente como solución transparente, suspensión opalescente (nanopartículas) o agregados. La formación de nanopartículas se confirmó por Dynamic Light Scattering (DLS), con un detector Viscotek. Se determinó el pH de la solución de TPP que dio lugar a nanopartículas de menor tamaño, utilizando soluciones de TPP a tres valores de pH distintos (9; 5,5 y 4).

Para aislar las nanopartículas del posible quitosano libre se centrifugaron las suspensiones a 13000 rpm durante 1 hora y se resuspendieron las nanopartículas en HBSS (pH 6) para los estudios en cultivos celulares.

5 Caracterización

5.1 Estudios de morfología

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) presentadas en esta memoria se obtuvieron en el Centro de Microscopía de la Universidad Complutense de Madrid.

Las muestras de microesferas, se adhirieron con una cinta de doble haz adhesivo sobre los portamuestras cilíndricos.

Para observar los cortes transversales de las películas de quitosano, se obtuvieron fragmentos de las mismas mediante criofractura con nitrógeno líquido y se montaron sobre los portamuestras.

Las muestras se metalizaron con Au/Pd utilizando un evaporador a vacío (Balzers SDC 004 Sputter coater, Oerlikon Corporate Pfäffikon, Switzerland) a una presión de vacío de 0,1mbar y a 25mA, durante 3 minutos. Se empleó un microscopio JEOL JSM-6400 (JEOL, Tokyo, Japan), el cual trabajó a un voltaje de aceleración de electrones de 5kV.

5.2 Determinación de la carga eléctrica superficial de microesferas y nanopartículas

El potencial zeta de las microesferas se determinó por espectroscopia de correlación fotónica empleando un Malvern Zetasizer Nanoseries Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania). Las muestras se prepararon de la siguiente forma: se suspendieron 25mg de microesferas en 2,5mL de etanol, se tomó 0,5mL de la suspensión y se diluyó hasta 50mL con una solución de KCl 10^{-3} M. La medida del potencial zeta se realizó utilizando cubetas desechables DTS 1060 (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania), con un voltaje efectivo de 150V, a 25°C.

El potencial zeta de las nanopartículas y de la solución de hidrocloreuro de quitosano utilizada para obtenerlas se determinó en un Zetasizer 2000 (Malvern instruments). Los datos de movilidad electroforética (U_E) fueron automáticamente traducidos a valores de potencial zeta, utilizando la ecuación de Henry [100].

$$U_E = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa \cdot a)}{3\eta} \quad (\text{II.2})$$

donde ε es la constante dieléctrica, ζ el potencial zeta, η la viscosidad y $f(\kappa a)$ la función de Henry.

La unidad de κ , distancia de Debye, es la recíproca de la distancia, y generalmente se toma κ^{-1} como el grosor de la doble capa eléctrica. El parámetro a es el radio de la partícula y por tanto $\kappa \cdot a$ es la relación del radio de la partícula con la doble capa eléctrica.

Se empleó la aproximación de Helmholtz–Smoluchowski [101], en la que el valor de $F(\kappa a)$ es 1,5. Esta aproximación es válida para partículas de tamaño superior a $0,2\mu\text{m}$ dispersas en electrolitos con una concentración de sales superior a 10^{-3} M.

5.3 Estudios de interacción fármaco-polímero

5.3.1 Difracción de rayos X

Los estudios de difracción de rayos X de las muestras en polvo (tanto microesferas como películas) se realizaron con un difractómetro automático PHILIPS X'PERT MPD perteneciente al CAI (Centro de Ayuda a la Investigación) de DRX (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid). El equipo tiene un goniómetro PW3050 (θ -2 θ), y la potencia del generador se fijó a 45kV y 40mA. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente con radiación Cu K α_1 (longitud de onda 1,54056Å), con monocromador de grafito y en geometría confocalizada (Bragg-Brentano). Se fijó el tamaño de paso (2 θ) de las medidas en 0,040°, y en 1segundo la duración del paso. El rango angular estudiado fue de 5° a 40° 2 θ .

El índice o porcentaje de cristalinidad (ICr) de las películas de quitosano se determinó según el método propuesto por Segal (1959) para la celulosa [102] y adaptado al quitosano mediante la ecuación:

$$\text{ICr (\%)} = (I_{110} - I_{\text{am}} / I_{110}) \cdot 100 \quad (\text{II.3})$$

donde I_{110} es la intensidad máxima de la reflexión a $2\theta = 20^\circ$ y I_{am} es la intensidad mínima de la difracción en la región amorfa a $2\theta = 16^\circ$ aproximadamente [103-105]. El error estándar de este método es de 3,7% [102, 106].

5.3.2 Espectroscopia de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo de las películas se obtuvieron con un Magna-IR 750 (Nicolet) por el método de transmisión (Unidad de Espectroscopía de Infrarrojo, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid). Las muestras se midieron con un beamsplitter de KBr y un detector DTGS de KBr entre 400 y 4000 cm^{-1} de longitud de onda. El espectro tenía una resolución de 4 cm^{-1} y, en el caso del quitosano en polvo, el número de acumulaciones fue de 50. Las muestras de películas de quitosano se midieron a 4 cm^{-1} con 64 acumulaciones. Los espectros obtenidos se analizaron con WinfirstTM (Microsoft® Windows FTIR software, USA).

5.4 Reacción de entrecruzamiento del hidrocloreuro de quitosano y la genipina

Se preparó una solución de hidrocloreuro de quitosano 0,5% (p/v) en agua destilada, se añadió una solución de genipina (0,5-5mM) y se incubó la solución a distintos intervalos de tiempo (30min-7h) y a diferentes temperaturas (25-50°C).

El seguimiento de la reacción de entrecruzamiento entre el hidrocloreuro de quitosano y la genipina se llevó a cabo por espectroscopía UV-VIS. Se realizó un barrido en el rango de longitud de onda de 200 a 700nm a 2nm de resolución para determinar el espectro de absorción UV-VIS de la genipina. Así mismo, se realizaron barridos en el rango 200-330nm de las soluciones de hidrocloreuro de quitosano y genipina con diferentes condiciones de reacción (tiempo y concentración de genipina) para observar los posibles cambios producidos en el espectro inicial al reaccionar ambos compuestos.

5.5 Determinación del grado de entrecruzamiento con genipina

El grado de entrecruzamiento del hidrocloreuro de quitosano y la genipina se determinó por el método de la ninhidrina[107]. Este método determina el porcentaje de grupos amino que quedan libres en la solución de quitosano después de que haya tenido lugar el entrecruzamiento. La solución de ninhidrina estaba compuesta por: Solución A: 1,05g ácido cítrico, 10mL NaOH (1M) y 0,04g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 25mL de agua bidestilada; Solución B: 1g ninhidrina en 25mL de etilenglycol monometil eter. Se mezcló la solución A con la B y se dejó en agitación durante 45 min. Para el ensayo, se calentó una alícuota de 100 μL de cada solución problema (sin genipina como blanco y con genipina de diferentes concentraciones) con 1mL de la solución de ninhidrina a 100 °C en un baño durante 20 min. Se enfrió la muestra en hielo, se diluyó con 5mL de isopropanol al 50% y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570nm. La cantidad de grupos amino libres en las muestras, tras calentarlas con ninhidrina, es proporcional a la absorbancia de la solución. La concentración de grupos amino libres se determinó a partir de una curva de calibrado de absorbancia frente a la concentración de glucosamina (equivalente a la concentración de grupos amino libres). El grado de entrecruzamiento (G) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$G (\%) = [(\text{NH}_2_{\text{inicial}} - \text{NH}_2_{\text{final}}) / \text{NH}_2_{\text{inicial}}] \times 100 \quad (\text{II.4})$$

donde $\text{NH}_2_{\text{inicial}}$ es la cantidad de grupos amino libres en la muestra sin entrecruzar y $\text{NH}_2_{\text{final}}$ es la cantidad de grupos amino libres en las muestras entrecruzadas.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.6 Estudios de hinchamiento de las películas de quitosano

El hinchamiento de las películas se llevó a cabo en PBS a pH 7,4. Se utilizaron para ello muestras de películas con una superficie de 2cm^2 y que no contenían principio activo. Se pesó el fragmento de película en una placa *Petri* y se anotó su peso exacto, se añadieron 10mL de medio atemperado a 37°C y se incubó en un agitador orbital (Rotabit, Selecta, J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) a 37°C y 100 rpm. A intervalos de tiempos predeterminados, la película se extrajo y, de forma rápida y cuidadosa, se secó ligeramente sobre un papel de filtro para eliminar el exceso de líquido, se pesó y se volvió a introducir en la placa. El grado de hinchamiento (W) se determinó mediante la siguiente expresión [54]:

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \quad (\text{II.5})$$

donde M es el peso a tiempo t y M_0 el peso a tiempo cero.

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía.

5.7 Determinación de la cantidad de quitosano unido a las nanopartículas

La concentración de hidrocloreuro de quitosano presente en las nanopartículas se determinó por el método colorimétrico descrito por Miralles *et al.* (2009) [108]. Se preparó una solución tampón a pH 3,2, pesando 1,87g de glicina y 1,46g de NaCl, y enrasando a 250mL. A esta solución se le añadió HCl 0,1M hasta ajustar el pH a 3,2. Por otro lado se preparó la solución de colorante (Cibacron Brilliant Red 3B-A), pesando 150mg del colorante y enrasando hasta 100mL con agua bidestilada (1,5g/L). De esta solución madre de colorante se diluyó 1/20 (v/v), de modo que la concentración de trabajo fue 0,075g/L. Se preparó una solución de hidrocloreuro de quitosano de 4g/L en agua destilada y se diluyó hasta lograr una concentración de 0,5mg/mL. La solución de quitosano resultante se utilizó para realizar una curva patrón a partir de sucesivas diluciones de la misma, entre $2,3\mu\text{g/mL}$ y $37,9\mu\text{g/mL}$. Tras centrifugar las suspensiones de nanopartículas a 13000rpm durante 1 hora, se recuperó el sobrenadante, se tomaron distintos volúmenes y se le añadió solución tampón a pH 3,2, hasta un volumen de $300\mu\text{L}$. Después se le añadieron 3mL de solución colorante, y se midió su absorbancia

por espectrofotometría UV-VIS a 575nm, que es la longitud de onda a la que está el máximo de absorción del complejo coloreado formado entre el quitosano y el Cibacron Brilliant Red. Se obtuvo el valor de concentración extrapolando el valor resultante en la curva patrón. Se empleó un espectrofotómetro UV-VIS modelo GBC UV/Visible 920 (GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia).

Los experimentos se realizaron por triplicado.

6 Estudios de liberación *in vitro*

6.1 Microesferas de claritromicina

La liberación *in vitro* de claritromicina se realizó suspendiendo 50mg de microesferas en 5mL de fluido gástrico simulado (SGF) sin enzimas dentro de una bolsa de diálisis de celulosa de 12000 Da de diámetro de poro (Sigma- Aldrich, Madrid, España) para evitar la pérdida de microesferas durante la toma de muestras. La bolsa se introdujo después en un recipiente que contenía 50mL de SGF, a 37°C y 100 rpm de agitación. Se tomaron muestras de 0,5mL a intervalos de tiempo predeterminados y fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 25mm de diámetro y 0,20µm de diámetro de poro (Albet, Barcelona, España).

Todas las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un cromatógrafo Waters® 625 (Waters Corporation, Milford Massachusetts, Estados Unidos) acoplado a un detector de tipo fotodiodo array (PDA Waters® 996, Waters Corporation, Milford Massachusetts, Estados Unidos). La separación se hizo con una columna Licrospher 100 RP 18 de 125mm x 4,6mm x 5µm (Sugelabor S.A., Madrid, España). El análisis se realizó con un flujo isocrático de 1,2mL/min, utilizando como fase móvil acetonitrilo-metanol-agua con una relación de volúmenes 39:9:52 y una concentración de 0,04M de NaH₂PO₄ [24]. Los analitos se detectaron a una longitud de onda de $\lambda = 205\text{nm}$. El volumen inyectado fue 20µL. La columna se mantuvo a 50°C en un horno de columna acoplado a un controlador de temperatura (Waters Corporation, Milford Massachusetts, Estados Unidos), según las recomendaciones de la USP 23[109]. Los picos cromatográficos se digitalizaron e integraron con ayuda del software Empower® (Waters Corporation, Milford Massachusetts, Estados Unidos).

Previamente al análisis de las muestras de antibiótico, se realizó una curva de calibrado en SGF de la concentración de claritromicina en función del área bajo la curva del pico

cromatográfico de la misma a 2,1 minutos. Las soluciones de claritromicina empleadas en ácido clorhídrico 0,1N tenían un rango de concentraciones entre 0,05 y 5mg/mL.

Se realizaron los ajustes de los perfiles de liberación en SGF de las microesferas a los modelos matemáticos de orden cero, Higuchi, Hixon-Crowell, Baker-Lonsdale y Korsmeyer-Peppas, reflejados en el Apartado 10 de la Introducción, para describir los perfiles de disolución/liberación de las microesferas. Se ajustó el perfil de liberación de fármaco en función del tiempo a una ecuación lineal para obtener la constante de orden cero; se representó el porcentaje de claritromicina liberada frente al valor de la raíz cuadrada del tiempo para obtener la constante de Higuchi (K_H); el valor de la raíz cúbica de la cantidad de fármaco remanente en las microesferas frente a t para obtener la constante de Hixon-Crowell; y el valor de la función ft frente al tiempo para obtener el valor de la constante de Baker-Lonsdale. En los casos en los que se observó que el mecanismo de liberación era difusional, se calculó el exponente difusional (n) según la ecuación de Korsmeyer-Peppas (II.5) [95], representando los valores de $\log (M_t/M_{max})$ frente al $\log t$.

$$M_t/M_{\infty} = Kt^n \quad (\text{II.6})$$

$$\log (M_t/M_{\infty}) = \log K + n \log t \quad (\text{II.7})$$

donde M_t es la cantidad de fármaco liberado a tiempo t y M_{∞} la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito. Al realizar los cálculos de las liberaciones, se tuvieron en cuenta los volúmenes tomados para las muestras y los del medio añadido. Los estudios de liberación se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por medio de ANOVA.

6.2 Microesferas de hidrocloreuro de tramadol

Se pesaron 25mg de microesferas en 5mL de medio de liberación (fluido intestinal simulado (SIF) y fluido gástrico simulado, sin enzimas) dentro de una bolsa de diálisis al igual que en el caso anterior. La bolsa se introdujo después en un recipiente que contenía 200mL de medio de liberación, a 37°C y 100 rpm de agitación. A tiempos predeterminados se tomaron muestras de 2mL, reponiéndose con la misma cantidad de medio y a la misma temperatura, para mantener el volumen constante.

Para la cuantificación del tramadol se utilizó la técnica de espectrofotometría UV-VIS. Se seleccionó un rango de longitudes de onda tomando como base datos teóricos de la

bibliografía consultada. Este se fijó entre 200 y 400nm y se realizaron varios barridos del hidrocloreto de tramadol disuelto en varios medios: agua destilada, SGF y SIF, siendo la máxima absorción a 271nm. Una vez seleccionada la longitud de onda correspondiente a la máxima absorción, se realizó una curva de calibrado con concentraciones conocidas del principio activo, en los tres medios citados. Las muestras extraídas se leyeron a la longitud de onda determinada, frente al blanco correspondiente, y se cuantificaron en función de la curva de calibrado obtenida.

Se realizaron los ajustes de los perfiles de liberación en los medios SGF y SIF a los modelos matemáticos de orden cero, Higuchi, Hixon-Crowell, Baker-Lonsdale y Korsmeyer-Peppas. Los estudios de liberación se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por medio de ANOVA.

6.3 Películas de quitosano con hidrocloreto de ciprofloxacino

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo introduciendo la película de quitosano cargada con hidrocloreto de ciprofloxacino en 900mL de PBS a pH 7,4 e incubando en un agitador orbital en las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado anterior. A tiempos predeterminados se tomaron 2mL del medio de liberación y se reposó con el mismo volumen de medio. La cantidad de fármaco liberado en cada tiempo se determinó por espectrofotometría UV-VIS. La longitud de onda correspondiente a la máxima absorción se determinó mediante barridos entre 200 y 400nm, siendo de 274nm.

Se realizaron los ajustes de los perfiles de liberación a los modelos matemáticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Los estudios de liberación se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron con ANOVA de una vía para cada tiempo.

7 Cultivos celulares

7.1 Células Calu-3

Las células Calu-3 se sembraron en flasks de 75 cm³ a 5% CO₂ y 37°C. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se sembraron en soportes permeables (Costar Transwell[®] plates, High Wycombe, UK) con membranas de poliestireno (12 mm de diámetro, 0,4 µm tamaño de poro) a una densidad de siembra de 100000 células por pocillo. Tras sembrarlas se mantuvieron a 5% CO₂, 37°C en EMEM suplementado con

FBS (suero fetal bovino), antibiótico/antimicótico y L-glutamina. Durante el tiempo de cultivo, el medio se renovó cada dos días.

El crecimiento celular y la formación de uniones estrechas se comprobó por determinaciones de TEER, que se realizaron cada dos días empezando el día 7 después de la siembra. Se evitó la medida diaria de TEER debido a la posibilidad de dañar la monocapa celular, tanto por el método de medida como por la liberación de iones desde los electrodos. La resistencia basal se tuvo en cuenta midiéndola a través de membranas sin células y restándole esta determinación a la TEER de la monocapa.

7.2 Ensayo de toxicidad MTS

Con el objeto de estudiar el efecto del hidrocloreuro de quitosano en solución y en forma de nanopartículas sobre la actividad metabólica de las dos líneas celulares se realizó el ensayo de toxicidad MTS. Este ensayo está basado en la conversión de una sal de tetrazolio por enzimas celulares en un producto que es soluble en el medio de cultivo conocido como formazan. Esta conversión es producida por la NADH (forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina) producido por la deshidrogenasa en células metabólicamente activas.

Las células Calu-3 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10000 células por pocillo. Se incubaron durante 24 horas antes del ensayo. Se aspiró el medio y se sustituyó por las soluciones de las muestras, que consistían en nanopartículas o solución de quitosano en HBSS a diferentes concentraciones. El medio HBSS y el surfactante Triton-X 100 (0,1% p/v) se emplearon como control. Las células se incubaron con las muestras durante 2 horas, tras las cuales se aspiraron y se sustituyeron por 100µL de medio de cultivo. Se añadieron 20µL del reactivo MTS (CellTiter 96[®] AQueous One Solution) a los pocillos y, tras incubar las células durante 1 hora, se midió la absorbancia a 490nm en un lector de placas. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía. El porcentaje de actividad metabólica (AM) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$AM (\%) = (A_{\text{muestra}} / A_{\text{HBSS}}) \cdot 100 \quad (\text{II.8})$$

donde la A_{muestra} es la absorbancia de la muestra problema y A_{HBSS} es la absorbancia del medio HBSS.

7.3 Ensayo de liberación de LDH

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que está presente en las células. Cuando las membranas citoplasmáticas sufren algún daño, se produce la liberación de LDH, por lo que su cuantificación en los sobrenadantes del cultivo celular se puede utilizar como indicador de muerte celular.

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad 10000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas antes del ensayo. Se aspiró el medio de cultivo y se sustituyó por las soluciones de muestra (al igual que para el ensayo de toxicidad MTS). El HBSS y el reactivo Triton-X 100 (0,1% p/v) se emplearon como control. Las células se incubaron con las muestras durante 2 horas, tras las cuales se retiraron 50µL de cada pocillo. En una nueva placa multipocillo se añadieron 100 µL del reactivo LDH (TOX7, Sigma-Aldrich) a los 50µL retirados de muestra, se incubaron durante 20-30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 490nm en un lector de placas. Los experimentos se realizaron por cuádruplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía. El porcentaje de LDH liberada se determinó mediante la fórmula:

$$\text{LDH liberada (\%)} = (A_{\text{muestra}} / A_{\text{triton X}}) \cdot 100 \quad (\text{II.9})$$

donde la A_{muestra} es la absorbancia de muestra problema y $A_{\text{triton X}}$ es la absorbancia del Triton X.

7.4 Determinación de la resistencia transepitelial

Se estudió el efecto del hidrocloreuro de quitosano en solución y en forma de nanopartículas sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las monocapas de las células Calu-3, ya que ésta indica el estado de las uniones estrechas entre células. El estudio se realizó con las células sembradas en soportes permeables, que se dejaron crecer hasta la confluencia de acuerdo con el protocolo explicado anteriormente. Las nanopartículas y la solución en HBSS (pH 6) y en distintas concentraciones se añadieron a la parte apical de las monocapas. Tras un período de incubación de dos horas, se retiraron las muestras y se lavaron las células con PBS para eliminar cualquier resto de hidrocloreuro de quitosano. Se añadió medio de cultivo fresco y se incubaron las células otras 22 horas para determinar si cualquier cambio producido en la TEER era reversible. La TEER se midió con un voltímetro EVOM World Precision Instruments, UK) equipado con un par de electrodos. En la Figura II.2 se muestra un esquema de la

medida de la TEER en una placa de soportes permeables y un detalle de la medida en un uno de los soportes. Las medidas se tomaron a 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 y 24 horas tras la adición de las muestras de quitosano. Las medidas de 0; 0,5; 1; 1,5 y 2 horas se realizaron en HBSS, mientras que las de 4 y 24 horas se hicieron ya en medio de cultivo. Las monocapas celulares incubadas primero con HBSS y después con medio de cultivo se utilizaron como referencia (control). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía para cada tiempo.

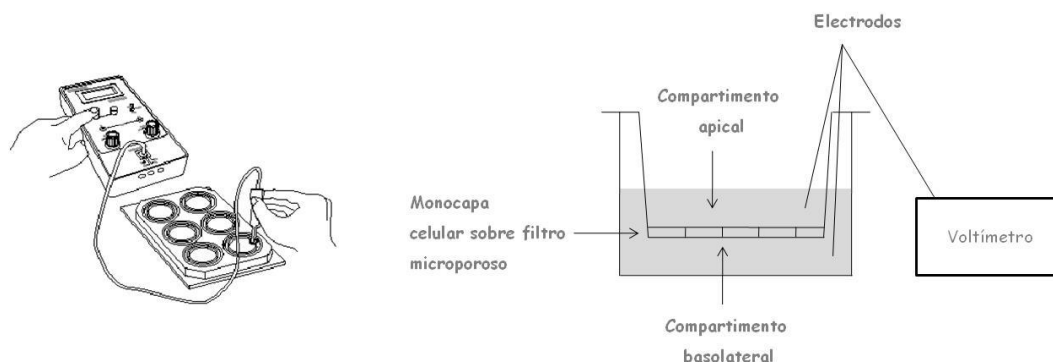


Figura II.2. Esquema de la medida de la TEER en soportes permeables y detalle de la medida en uno de los soportes.

7.5 Ensayos de permeabilidad celular

Para este estudio se empleó, como modelo macromolecular, dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína. Se utilizaron dextransos de dos pesos moleculares diferentes, 4400 (FD 4) y 10000 (FD10). Éste no se incorporó a las nanopartículas, sino que se añadió a las monocapas junto con el hidrócloruro de quitosano en solución o en forma de nanopartículas. Sólo las monocapas celulares con una TEER $> 500 \Omega\text{cm}^2$ se incluyeron en el experimento (las monocapas con una TEER significativamente menor se consideraron no confluentes).

Se retiró el medio de cultivo (EMEM) y se lavaron las monocapas con PBS. Se añadió HBSS atemperado al compartimento aceptor del soporte permeable (1,5mL), seguido de 0,5mL de la solución muestra en el compartimento donante. Las muestras consistieron en nanopartículas de HCS y TPP o soluciones de HCS al 0,003% (p/v) en HBSS (pH 6). Posteriormente, se añadió el dextrano marcado a una concentración de 500 $\mu\text{L/mL}$ para comenzar el experimento. Las monocapas se incubaron a 5% CO_2 y 37°C. Se tomaron muestras de 100 μL del compartimento basolateral a los siguientes tiempos: 30, 60, 90,

120, 150 y 180 min. Este volumen se repuso inmediatamente con HBSS para mantener las condiciones sumidero. También se tomaron muestras de la solución en el compartimento apical a $t=0$ y 180 min para determinar la concentración de dextrano marcado al principio y al final del experimento de permeabilidad. Las muestras tomadas se transfirieron a una placa de 96 pocillos, se cubrió para protegerlas de la luz y se determinó la cantidad de dextrano FD4 y FD10 para cada tiempo por fluorescencia (Ex 506nm, Em 529nm).

La permeabilidad (P_{app}) se expresa como coeficiente de permeabilidad aparente, calculado mediante la ecuación:

$$P_{app} = (dQ/dt) / (A \cdot C_o) \quad (II.10)$$

donde P_{app} es la permeabilidad aparente en cm/s, dQ/dt es la tasa de permeabilidad, A es el área de difusión de la monocapa (cm²) y C_o es la concentración inicial de dextrano.

Tras la última muestra, las soluciones con FD4 y FD10 se aspiraron de los pocillos y se lavaron las membranas celulares con PBS dos veces. Se añadió medio de cultivo a los pocillos y se realizaron medidas de TEER para comprobar el estado de las uniones estrechas.

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía.

Cuadro resumen del trabajo realizado

Componentes de las formulaciones		
<i>Principios activos (PA)</i>		Claritromicina
		Hidrocloruro de tramadol
		Hidrocloruro de ciprofloxacino
<i>Polímeros</i>		Quitosano (CS)
		Hidrocloruro de quitosano (HCS)
<i>Agentes entrecruzantes</i>		Tripolifosfato sódico (TPP)
		Genipina (Gnp)
Sistemas de liberación preparados		Técnicas utilizadas
<i>Microesferas</i>		Atomización
<i>Películas</i>		Evaporación de solvente
<i>Nanopartículas</i>		Gelificación ionotrópica
Estudios realizados		
<i>Microesferas</i>	<i>Caracterización</i>	Morfología, distribución de tamaño, potencial zeta, DRX, grado de entrecruzamiento, rendimiento de atomización y eficiencia de encapsulación
	<i>Liberación in vitro de los principios activos</i>	SGF pH 1,2 SIF pH 7,4
<i>Películas</i>	<i>Caracterización</i>	Morfología, hinchamiento, DRX, FT-IR y eficiencia de encapsulación
	<i>Liberación in vitro de los principios activos</i>	SIF pH 7,4
<i>Nanopartículas</i>	<i>Caracterización</i>	Distribución de tamaño, potencial zeta y cantidad de quitosano unido
	<i>Efecto de nanopartículas y solución de quitosano sobre células Calu-3</i>	Citotoxicidad, resistencia transepitelial (TEER) y permeabilidad celular

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con claritromicina obtenidas por atomización

La claritromicina es un fármaco de carácter básico y poco hidrosoluble que presenta una pobre o variable absorción y que es inestable a pH ácido. Su combinación con un polímero mucoadhesivo como el quitosano puede, además de proteger al fármaco, promover su absorción a nivel de la mucosa gástrica.

La atomización es un proceso rápido y sencillo para la producción de microesferas cargadas con principios activos hidrofílicos y lipofílicos. Además, es un método con el que se pueden obtener altas eficiencias de encapsulación. Por todo ello es utilizado en la industria farmacéutica para obtener micropartículas [23].

El objetivo de este capítulo ha sido la obtención por atomización de microesferas de hidrocloreuro de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato sódico o genipina para la encapsulación de claritromicina. Una vez obtenidas las microesferas, el trabajo se ha centrado en su caracterización: morfología, carga superficial e interacción fármaco-polímero. Por último se realizaron estudios de liberación *in vitro*.

1.1 Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con claritromicina entrecruzadas con tripolifosfato sódico

El tripolifosfato sódico (TPP) es un agente entrecruzante no tóxico empleado en la industria farmacéutica para la preparación de microcápsulas y microesferas, ya que su unión con el quitosano tiene una gran capacidad de gelificación.

Se estudió la influencia de tres variables sobre la liberación de claritromicina:

- Concentración de HCS (0,1-1% p/v)
- Concentración de TPP (0-0,2% p/v)
- pH de la solución de TPP (4 y 9)

1.1.1 Obtención de las microesferas

En la Tabla III.1 se resumen las características de todas las microesferas obtenidas, con las distintas concentraciones de hidrocloreuro de quitosano y TPP y los diferentes valores de pH de la solución de TPP.

Es de destacar que la claritromicina no es soluble en agua, por lo que se ajustó el pH de la solución de hidrocloreuro de quitosano a pH 4. También es importante señalar que, a altas concentraciones de hidrocloreuro de quitosano, la adición de TPP a pH 9 provocó la formación de agregados, de ahí que a este pH, sólo se obtuvieron microesferas con HCS 0,1% (p/v).

Tabla III.1. Condiciones de preparación de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano (HCS) cargadas con claritromicina (CLA) y entrecruzadas con TPP.

Lote	HCS (% p/v)	CLA (% p/p)	TPP (% p/v)	pH TPP
<i>C1</i>	1	---	---	---
<i>C2</i>	1	50	---	---
<i>C3</i>	1	50	0,1	4
<i>C4</i>	1	50	0,2	4
<i>C5</i>	0,5	50	---	---
<i>C6</i>	0,5	50	0,1	4
<i>C7</i>	0,5	50	0,2	4
<i>C8</i>	0,1	50	---	---
<i>C9</i>	0,1	50	0,1	9
<i>C10</i>	0,1	50	0,2	9
<i>C11</i>	0,1	50	0,1	4
<i>C12</i>	0,1	50	0,2	4

Los resultados obtenidos en la determinación del rendimiento de atomización y la eficiencia de encapsulación se muestran en la Tabla III.2. El rendimiento de atomización varió entre un 36 y un 70%. La viscosidad de la solución que se atomiza influye en el rendimiento final del proceso; en general las soluciones más viscosas dieron lugar a rendimientos inferiores. Se obtuvieron rendimientos de atomización altos en el caso de microesferas sin TPP. Sin embargo, las microesferas con TPP a pH 4 dieron lugar a los rendimientos más bajos debido a la mayor viscosidad de las soluciones atomizadas. Existen varios estudios en los que se han obtenido rendimientos similares a los obtenidos en este trabajo o inferiores [110-112]. Las pérdidas de producto se deben principalmente a la adhesión de material a las paredes del ciclón y

del compartimento de secado del equipo[113]. Además, existen pérdidas de las micropartículas más pequeñas y ligeras a través del sistema de aspiración[111]. El rendimiento también es menor cuando los lotes atomizados son pequeños [112, 114]. La eficiencia térmica de la atomización está relacionada con la energía térmica de entrada y con la cantidad de calor utilizada para la evaporación. La eficiencia óptima de atomización se puede lograr consiguiendo un balance entre la cantidad de calor aportado y la cantidad de calor necesaria para la evaporación, que está relacionada con la cantidad de muestra empleada[25].

En cuanto a la eficiencia de encapsulación, los valores obtenidos fueron altos, lo cual es un factor positivo para la aplicación industrial de la atomización. Se han descrito en la bibliografía eficiencias de encapsulación altas (>80%) para este método de encapsulación [110, 115, 116].

Tabla III.2. Rendimiento de atomización (RA) y eficiencia de encapsulación (EE) (media \pm SD) de microesferas de claritromicina obtenidas por atomización.

Lote	RA (%)	EE (%)
C1*	52	-
C2	57	96,57 \pm 3,89
C3	46,56	92,31 \pm 4,35
C4	36,55	85,13 \pm 3,97
C5	56,6	100 \pm 6,38
C6	37,62	85,49 \pm 3,97
C7	46,82	88,54 \pm 0,77
C8	64,7	96,57 \pm 0,74
C9	69,7	95,84 \pm 5,78
C10	69,9	80,74 \pm 3,27
C11	45,67	82,62 \pm 5,95
C12	50,31	75,54 \pm 4,07

*No contiene claritromicina

1.1.2 Estudios de morfología

En las Figuras III.1A y III.1B se muestra la morfología de las microesferas de hidrocloreto de quitosano sin fármaco ni agente entrecruzante y de las microesferas cargadas con claritromicina y entrecruzadas con TPP, respectivamente. Como puede observarse, las microesferas presentan forma esférica. En ningún caso se observan cristales en las microfotografías, lo cual indica que todo el fármaco ha sido encapsulado, puesto que la claritromicina es una sustancia cristalina. Las microesferas de hidrocloreto de quitosano presentan algunos hundimientos (Figura III.1A), mientras que las microesferas cargadas con claritromicina y TPP aparecen más colapsadas (Figura III.1B). Las mellas o hundimientos se producen como consecuencia del proceso de secado durante la atomización. En el proceso de atomización se deshidrata la capa externa de la esfera volviéndose rígida pero flexible y, al eliminarse todo el líquido del interior, se produce un hundimiento de la capa externa, de forma que la microesfera presenta al final un aspecto arrugado, tal y como describieron Martinac *et al.* (2005) en el caso de microesferas de etilcelulosa-quitosano cargadas con loratadina [111].

Estos resultados están en sintonía con otros similares que han sido descritos en la bibliografía. Desai y Park (2005) [117] observaron diferencias en la morfología superficial de microesferas atomizadas de quitosano tras la adición del fármaco y el agente entrecruzante. Tanto el entrecruzamiento con TPP como el fármaco dieron lugar a microesferas colapsadas. Stulzer *et al.* (2009) y Ventura *et al.* (2008) prepararon microesferas atomizadas con moxifloxacino entrecruzadas con glutaraldehído y microesferas con aciclovir y TPP respectivamente, observándose en ambos casos hundimientos en la superficie, que atribuyeron a la baja viscosidad de la solución de quitosano o al proceso de atomización [115, 118].

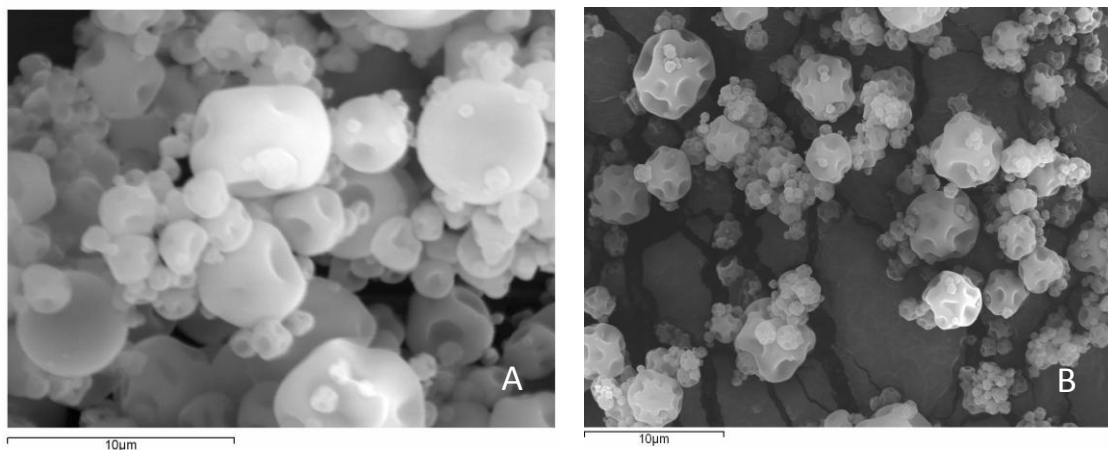


Figura III.1. Microfotografías electrónicas de microesferas de: A) HCS 1% (p/v) y B) HCS 1% (p/v) con claritromicina y TPP 0,1% (p/v).

1.1.3 Determinación de la carga superficial de las microesferas

El potencial zeta se midió para determinar la carga externa de las microesferas. Esta propiedad puede determinar el carácter mucoadhesivo de las mismas. La mucoadhesión permite aumentar el tiempo de retención del sistema de liberación en el epitelio y promueve, por tanto, la absorción del fármaco y una mayor eficacia terapéutica[57].

En general, como ocurre en este caso, la adición de polianiones provoca que las cargas positivas del quitosano se neutralicen, lo cual queda reflejado en el descenso del potencial zeta y, como consecuencia, es de esperar una disminución de las propiedades mucoadhesivas del polímero.

En la Tabla III.3 se muestran los resultados obtenidos en los estudios de potencial zeta. Como puede observarse, las microesferas presentaron mayoritariamente un potencial zeta positivo, lo cual es debido a la presencia de hidrocloreto de quitosano en su superficie. En general, se observaron diferencias en el valor del potencial zeta en función del grado de entrecruzamiento con TPP, siendo los valores de aquel inferiores en el caso de microesferas con grado de entrecruzamiento más alto. Las diferencias más significativas se observaron en las microesferas preparadas con HCS 0,1% (p/v) y TPP a pH 9, en las cuales el potencial zeta disminuyó al aumentar la concentración de TPP, llegando a valores negativos cuando se empleó la concentración más alta (TPP 0,2% p/v). En este caso el balance entre las cargas positivas y negativas de los complejos formados está ligeramente desplazado al lado negativo, lo cual puede ser debido a la

relación (p/p) 1:2 de HCS-TPP. En el resto, al ser mayor la cantidad de polimerización, el potencial zeta se mantiene positivo. Por otra parte, en las microesferas sin TPP también se observaron diferencias en los valores del potencial zeta en función de la concentración de hidrocloreto de quitosano, disminuyendo con la concentración del polímero, como era de esperar.

Tabla III.3. Valores del potencial zeta (media \pm SD) de las microesferas con diferentes concentraciones de hidrocloreto de quitosano (HCS) (0,1-1% p/v) y de TPP (0-0,2% p/v) y diferentes valores de pH de la solución de TPP (pH 4 y pH 9).

Lote	HCS (% p/v)	TPP (% p/v)	pH TPP	Potencial zeta (mV)
C1*	1	---	---	58,1 \pm 2,5
C2	1	---	---	49,3 \pm 5,4
C3	1	0,1	4	21,9 \pm 1,4
C4	1	0,2	4	21,0 \pm 1,4
C5	0,5	---	---	33,0 \pm 6,2
C6	0,5	0,1	4	23,3 \pm 1,5
C7	0,5	0,2	4	17,5 \pm 1,4
C8	0,1	---	---	23,9 \pm 0,9
C9	0,1	0,1	9	18,9 \pm 0,9
C10	0,1	0,2	9	-4,5 \pm 0,3
C11	0,1	0,1	4	16,6 \pm 0,8
C12	0,1	0,2	4	8,9 \pm 0,9

* No contiene claritromicina

El quitosano en solución, como hemos visto en el Capítulo de Introducción, está cargado positivamente debido a la protonación de los grupos amino. El TPP es un polianión que tiene gran capacidad para reaccionar iónicamente con el quitosano. La reacción del TPP con el quitosano provoca una disminución de los grupos amino libres de éste último y, por tanto, el potencial zeta debe disminuir. Las microesferas con cargas positivas en su superficie son capaces de adherirse a la mucosa y abrir de forma transitoria las uniones estrechas entre células epiteliales adyacentes, por lo que favorecen la absorción del principio activo [119]. Es importante que el potencial zeta no se anule para que las microesferas mantengan sus propiedades mucoadhesivas. Por lo tanto, las microesferas que dieron un potencial zeta negativo no favorecerían la

mucoadhesión. En el caso específico de la claritromicina esta mucoadhesión es decisiva porque promueve la acción local del antibiótico en el estómago, aumentando el tiempo de permanencia y promoviendo su absorción a través de la mucosa gástrica.

1.1.4 Interacción fármaco-polímero

La técnica de difracción de rayos X proporciona información sobre la estructura química y cristalina de un material puesto que cada sólido cristalino posee un patrón característico de difracción que puede emplearse para su identificación.

La cristalinidad del fármaco dentro de la matriz polimérica es un parámetro importante cuando se estudia la cinética de liberación de las microesferas.

En la Figura III.2 se muestran los difractogramas de rayos X del TPP (a), la claritromicina (b) y el hidrocloreuro de quitosano (c). Como puede observarse, la claritromicina y el TPP son sustancias cristalinas. La claritromicina presenta reflexiones a valores de $2\theta = 8,74^\circ; 9,62^\circ; 11,02^\circ; 11,66^\circ; 14,30^\circ; 15,34^\circ; 17,10^\circ; 19,18^\circ; 20,14^\circ; 20,62^\circ; 22,46^\circ; 23,38^\circ$ y $25,42^\circ$. El TPP presenta reflexiones a valores de $2\theta = 19,46^\circ; 19,98^\circ; 21,94^\circ; 22,02^\circ; 29,22^\circ; 31,9^\circ; 32,62^\circ; 36,06^\circ; 36,74^\circ$ y $38,34^\circ$. El difractograma del hidrocloreuro de quitosano, sin embargo, es característico de un compuesto amorfo.

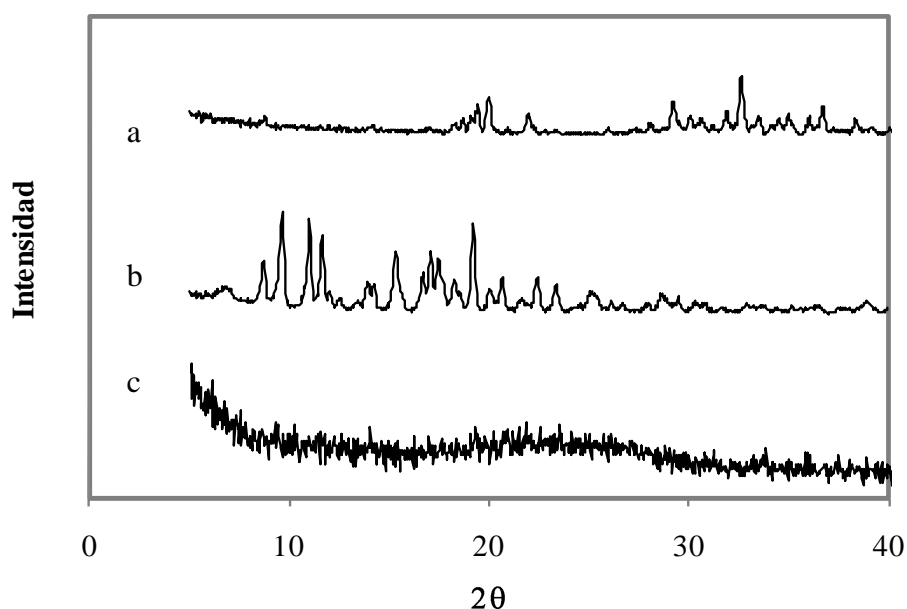


Figura III.2. Difractogramas de rayos X del TPP (a), la claritromicina (b) y del hidrocloreuro de quitosano (c).

Los difractogramas de rayos X de la mezcla física (d) de hidrocloreuro de quitosano, claritromicina y TPP y de las microesferas (e) de hidrocloreuro de quitosano (1% p/v) con claritromicina (50% p/p) y TPP (0,1% p/v), ambas muestras con las mismas proporciones de cada componente, se muestran en la Figura III.3. Se aprecia que la mezcla física presenta mayor cristalinidad que las microesferas. Esto es debido a que, como era de esperar, en la mezcla física no se ha producido ninguna interacción entre los componentes.

Las microesferas, sin embargo, presentan una estructura amorfa, de lo que se deduce que la claritromicina se encuentra totalmente embebida en la matriz polimérica, ya que no se observa la estructura cristalina del fármaco [25, 117]. Tampoco se observan reflexiones del TPP, por lo que éste ha interaccionado completamente con el hidrocloreuro de quitosano.

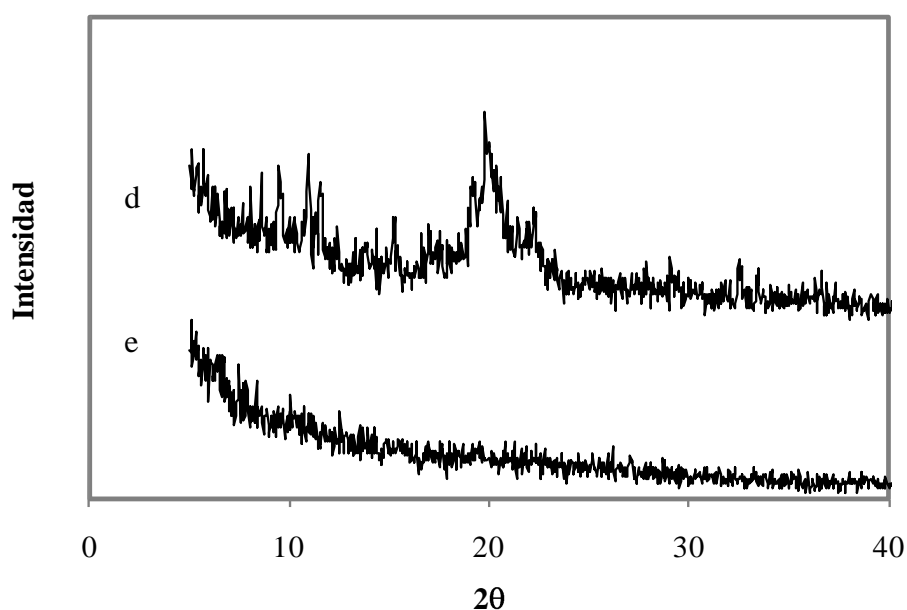


Figura III.3. Difractogramas de rayos X de la mezcla física de hidrocloreuro de quitosano, claritromicina y TPP (d) y de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano (1% p/v), claritromicina (50% p/p) y TPP (0,1% p/v) (e).

1.1.5 Estudios de liberación *in vitro*

El objetivo de la encapsulación de la claritromicina es su liberación a nivel gástrico para ejercer la acción antibiótica frente a las bacterias causantes de la úlcera gástrica, por lo que la liberación *in vitro* se realizó en medio gástrico simulado (SGF).

De los resultados obtenidos es importante destacar que las microesferas de hidrocloreto de quitosano sin entrecruzar no conservaron su forma al ponerse en contacto con medio ácido, se hincharon rápidamente y se disolvieron. Este hecho está de acuerdo con la bibliografía, que describe que para la obtención de microesferas más estables es necesario el uso de agentes entrecruzantes. Anal *et al.* (2006) [120] describieron la disolución de microesferas atomizadas sin TPP en SGF, mientras que entrecruzándolas con TPP obtuvieron sistemas más estables en medio ácido.

Se estudió la liberación de claritromicina en función de tres variables:

- Concentración de hidrocloreto de quitosano
- Grado de entrecruzamiento
- pH de la solución de TPP

Efecto de la concentración de hidrocloreto de quitosano

En la Figura III.4 se comparan los perfiles de liberación de microesferas obtenidas con diferentes concentraciones de HCS (0,1, 0,5 y 1% p/v). Como puede observarse existen diferencias en la velocidad de liberación en función de la concentración de polímero. Las microesferas obtenidas con 0,1 y 0,5% de HCS liberaron el 100% del fármaco total a las 3 horas de liberación y sus perfiles no presentaron diferencias significativas entre ellos para ninguno de los tiempos ($p > 0,05$). Las obtenidas con 1% (p/v) de HCS presentaron una liberación más lenta; pasadas 3 horas liberaron un 77% de claritromicina, cantidad significativamente menor ($p < 0,05$). El fármaco total encapsulado en estas microesferas fue liberado a las 6 horas.

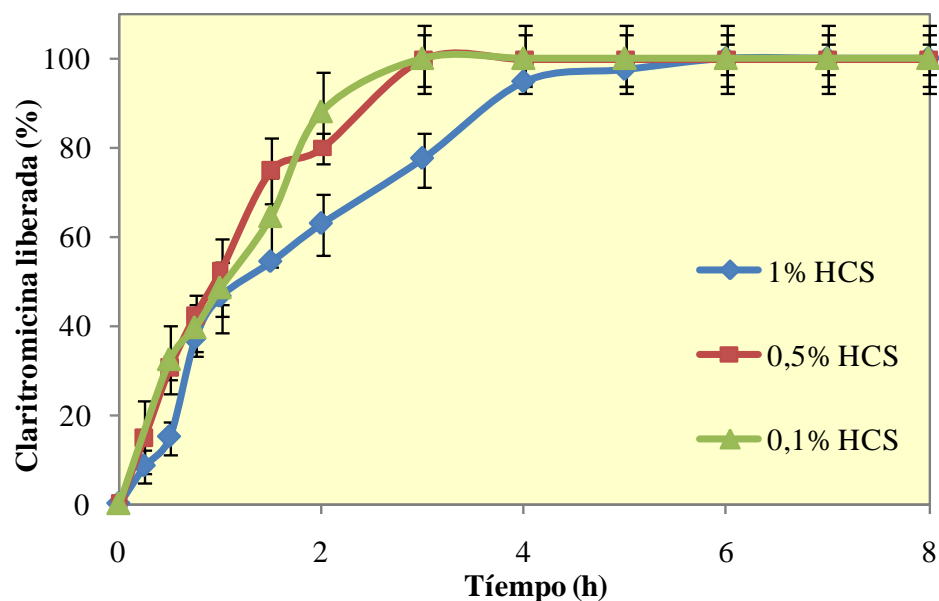


Figura III.4. Influencia de la concentración de HCS (0,1, 0,5 y 1% p/v) en la liberación de claritromicina de las microesferas, en SGF (pH 1,2) a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Ko *et al.* (2003) [121] observaron que las micropartículas con concentraciones altas de quitosano dieron lugar a matrices más densas, con menor capacidad de hinchamiento, menor velocidad de difusión y, por tanto, menor liberación de fármaco. Desai y Park (2005) [117] describieron una liberación más lenta del fármaco al aumentar la concentración del polímero.

La viscosidad de la solución de quitosano utilizada para la formación de las microesferas es un factor que afecta a la velocidad de liberación. Al aumentar la concentración de quitosano y, con ello, la viscosidad de la solución, el fármaco queda más atrapado en la matriz polimérica y la velocidad de liberación es menor.

Efecto de la concentración de TPP

En la Figura III.5 se muestran los perfiles de liberación de las microesferas de HCS 0,1% (p/v) sin TPP y entrecruzadas con diferentes concentraciones de TPP a pH 9, en SGF. Las microesferas con TPP 0,2% (p/v) presentaron las diferencias más significativas ($p < 0,05$) con respecto a las no entrecruzadas. Las microesferas sin TPP liberaron el 100% del fármaco encapsulado a las 3 horas, mientras que las microesferas entrecruzadas con 0,1 y 0,2% (p/v) TPP pH 9 liberaron a las 3 horas un 79% y un 47%, respectivamente, cantidades significativamente menores ($p < 0,05$) de fármaco que las

microesferas sin TPP. Por tanto, se puso de manifiesto el efecto del grado de entrecruzamiento sobre la liberación de fármaco.

Las microesferas preparadas con HCS 0,1% (p/v) y 0,1% (p/v) TPP presentan una relación p/p de HCS y TPP de 1:1. Las preparadas con 0,2% (p/v) TPP presentan una relación 1:2. Ésta última supone que habrá un grado de entrecruzamiento más alto entre TPP e hidrocloreuro de quitosano, reduciendo así la liberación de claritromicina con respecto a la relación 1:1. El mayor grado de entrecruzamiento se puso de manifiesto además con los resultados del potencial zeta (Tabla III.3), en los que las microesferas con una relación HCS-TPP 1:2 presentaron un ligero desplazamiento de las cargas de los complejos formados por HCS y TPP hacia un potencial zeta negativo.

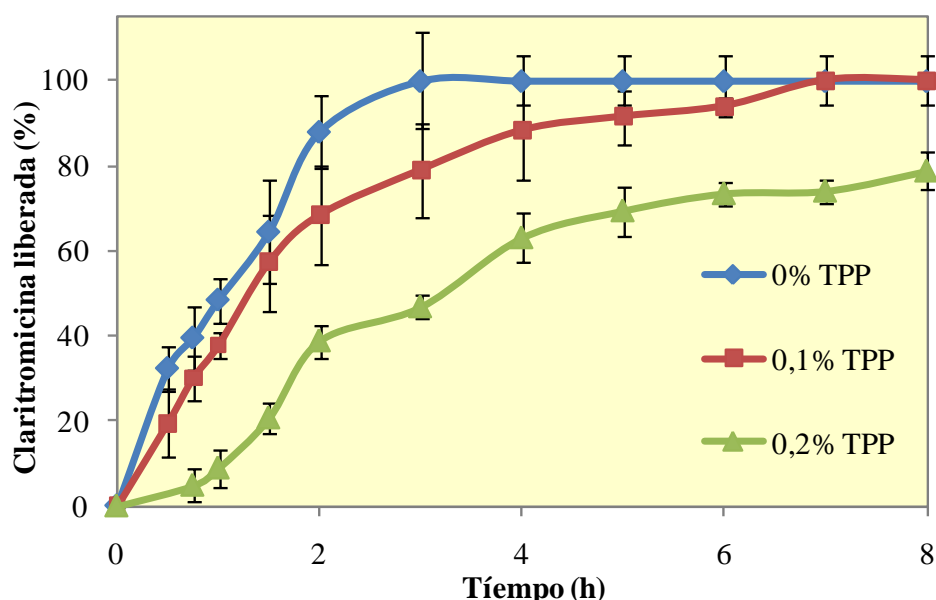


Figura III.5. Influencia de la concentración de TPP (0; 0,1 y 0,2% p/v) a pH 9 en la liberación de claritromicina de microesferas de HCS 0,1% (p/v), en SGF (pH 1,2) a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

A pH 4, como se detalló anteriormente, fue posible preparar microesferas con mayores concentraciones de hidrocloreuro de quitosano. En las Figuras III.6, III.7 y III.8 se muestran los perfiles de liberación de microesferas con diferentes concentraciones de HCS (0,1; 0,5 y 1% p/v) entrecruzadas con TPP 0,1 y 0,2% (p/v) a pH 4.

Como puede observarse en la Figura III.6, las microesferas entrecruzadas con TPP presentaron una liberación más lenta respecto a las no entrecruzadas, siendo las diferencias más significativas ($p < 0,05$) para todos los tiempos en el caso de las

microesferas con TPP 0,2% (p/v). Las microesferas con 1% (p/v) de HCS sin TPP liberaron el total de claritromicina encapsulada a las 4 horas. Las microesferas entrecruzadas con 0,1% (p/v) de TPP liberaron el 100% de claritromicina en 8 horas y, en igual tiempo las microesferas con 0,2% (p/v) de TPP liberaron el 85%. Estos resultados confirman que un mayor grado de entrecruzamiento disminuye la tasa de liberación de fármaco, debido al aumento de la densidad de la matriz. Ko *et al.* (2002) estudiaron la liberación de felodipina a partir de micropartículas de quitosano y TPP y observaron que tanto la disminución del pH del TPP como el aumento de su concentración reducía la cantidad de fármaco liberada [74].

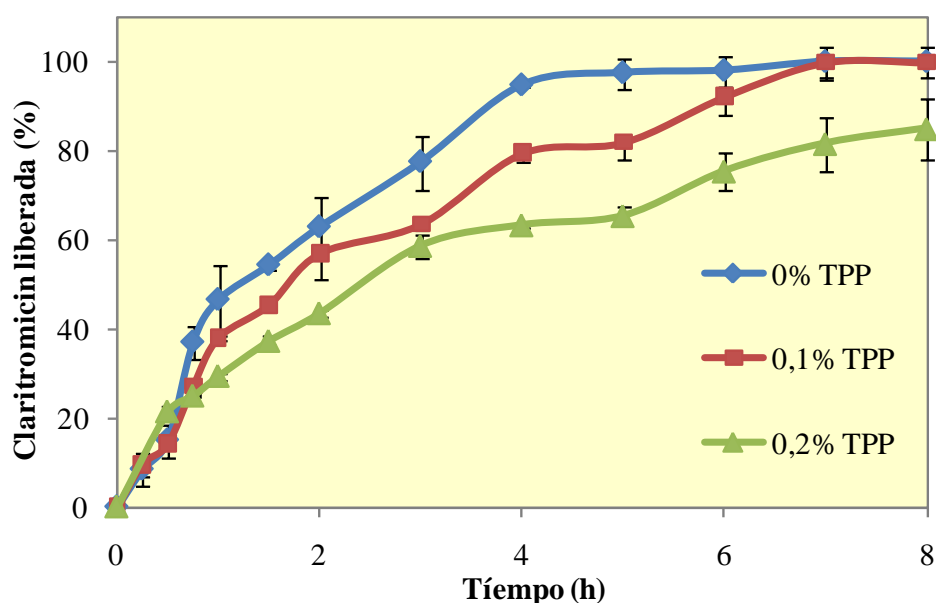


Figura III.6. Influencia de la concentración de TPP (0; 0,1 y 0,2% p/v) a pH 4 en la liberación de claritromicina de microesferas de HCS 1% (p/v), en SGF (pH 1,2) a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

En la Figura III.7 se muestran los perfiles de liberación de microesferas de hidrocloreuro de quitosano 0,5% (p/v) con diferentes concentraciones de TPP (0; 0,1 y 0,2% p/v) a pH 4. Como puede observarse, la liberación de microesferas sin TPP fue significativamente más rápida ($p < 0,05$). A las 3 horas se liberó el 100% de claritromicina de las microesferas sin entrecruzar, mientras que las entrecruzadas con TPP liberaron el 70% aproximadamente. Los perfiles de liberación de microesferas entrecruzadas con diferentes concentraciones de TPP fueron muy similares. Las diferencias sólo fueron significativas a partir de las 6 horas. El entrecruzamiento fue lo suficientemente alto

como para disminuir la liberación, pero no como para que hubiese diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de TPP.

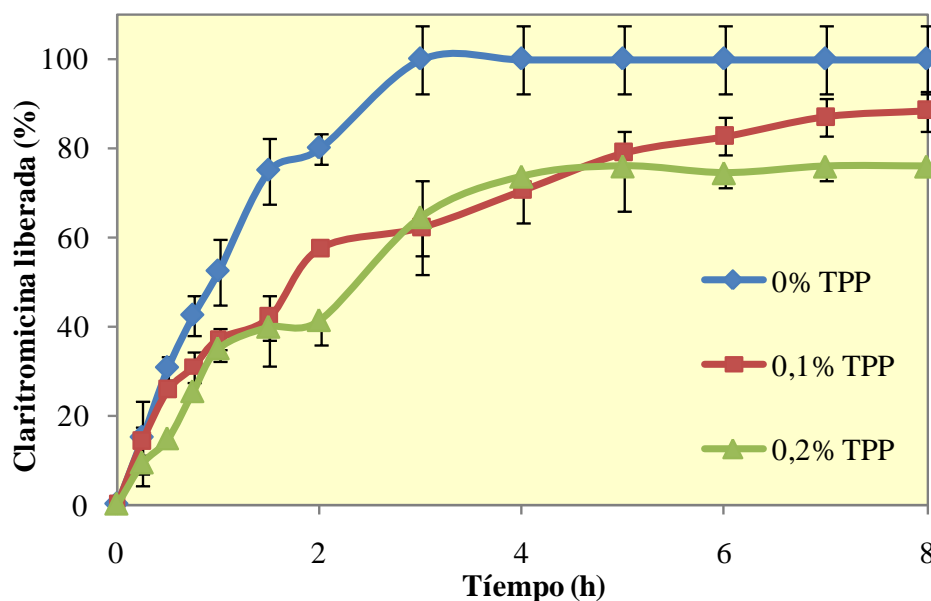


Figura III.7. Influencia de la concentración de TPP (0; 0,1 y 0,2% p/v) a pH 4 en la liberación de claritromicina de microesferas de HCS 0,5% (p/v), en SGF (pH 1,2) a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Los perfiles de liberación de microesferas de HCS 0,1% (p/v) con diferentes concentraciones de TPP 0, 0,1 y 0,2% (p/v) a pH 4 se muestran en la Figura III.8. Como puede observarse, a las 3 horas se liberó el 100% de claritromicina de las microesferas sin entrecruzar, mientras que las entrecruzadas liberaron el 60% aproximadamente. Al igual que en el caso de las microesferas con 0,5% HCS (p/v), los perfiles de liberación de las microesferas entrecruzadas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Por lo tanto, para las concentraciones de 0,1 y 0,5% (p/v) de hidrocloreto de quitosano, aunque el entrecruzamiento con TPP disminuyó significativamente la velocidad de liberación, la concentración de 0,2% (p/v) TPP no dio lugar a una reducción significativa en la cantidad de fármaco liberado con respecto a la de 0,1% (p/v).

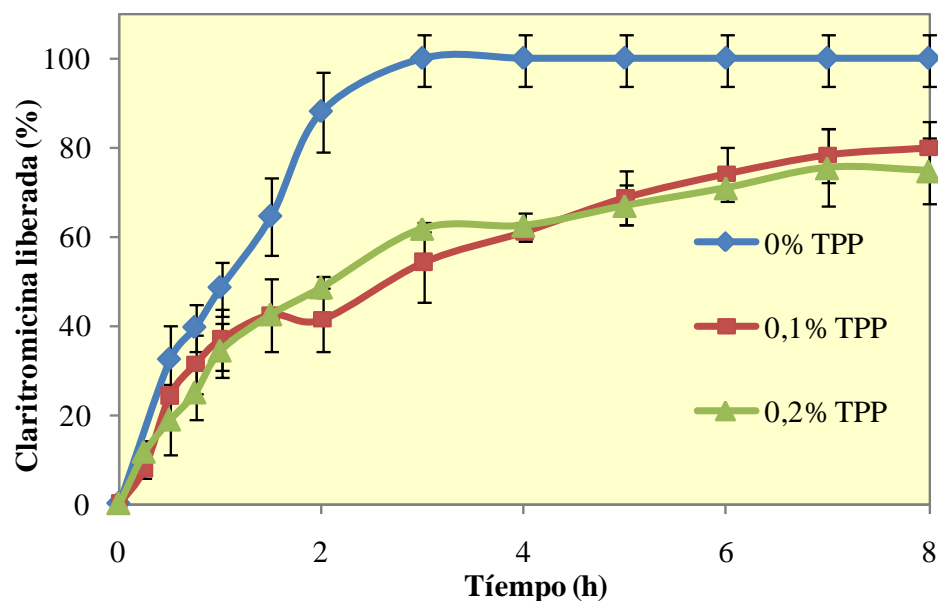


Figura III.8. Influencia de la concentración de TPP (0; 0,1 y 0,2% p/v) a pH 4 en la liberación de claritromicina de microesferas de HCS 0,1% (p/v), en SGF 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Efecto del pH de la solución de TPP

La influencia del pH de la solución de TPP sobre la liberación de claritromicina en las microesferas de hidrocloreto de quitosano se muestra en la Figura III.9. Como puede observarse, la liberación de microesferas con TPP a pH 9 resultó significativamente más rápida ($p < 0,05$) que las entrecruzadas con soluciones de TPP a pH 4. Pasadas 5 horas, las microesferas entrecruzadas con TPP a valores de pH 9 y 4 liberaron el 91 y 69% de claritromicina, respectivamente.

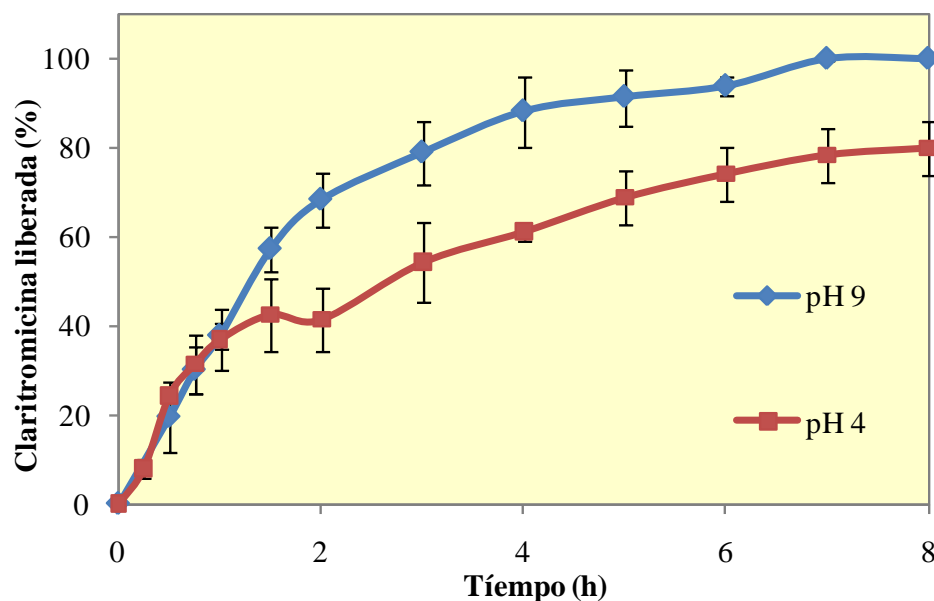


Figura III.9. Influencia del pH de la solución de TPP en la liberación de claritromicina de microesferas preparadas con 0,1% (p/v) HCS y 0,1% TPP (pH 4 y 9), en SGF pH 1,2 a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Estos resultados concuerdan con otros descritos en la bibliografía [16, 74, 75]. Como se explicó en el Capítulo de la Introducción, los pK_a del TPP son: $pK_1=1$, $pK_2=2$, $pK_3=2,79$, $pK_4=6,47$ y $pK_5=9,24$ [76]. El TPP disuelto en agua se disocia en iones tripolifosfóricos ($P_3O_{10}^{5-}$, $HP_3O_{10}^{4-}$ y $H_2P_3O_{10}^{3-}$). Durante la preparación de las microesferas, al poner en contacto la solución de quitosano con la de TPP a pH 9, los iones OH^- y tripolifosfóricos compiten por los grupos amino del quitosano. En este caso, el complejo quitosano-TPP se forma por ligero entrecruzamiento iónico, ya que habrá grupos amino desprotonados por los iones hidroxilo. Sin embargo, al ajustar el pH del TPP a un pH ácido, sólo existen iones tripolifosfóricos, que interaccionarán con los grupos amino protonados del quitosano. En este caso, el complejo quitosano-TPP se forma por enlaces inter o intramoleculares por entrecruzamiento iónico, dando lugar a una mayor densidad de entrecruzamiento iónico y mayor estabilidad del sistema. Esto explica los resultados de los estudios de liberación que se presentan en esta memoria, donde las microesferas preparadas con TPP a pH básico presentaron una liberación más rápida del principio activo.

Mi y cols (1999) [75] realizaron estudios de hinchamiento en micropartículas de quitosano y TPP. A pH 1 y 2, las preparadas con TPP a su pH en solución (pH 9), se hincharon rápidamente y se disolvieron en 12h, mientras que las preparadas con TPP a valores de pH ácido sólo se hincharon ligeramente y no se disolvieron. Por tanto, los complejos quitosano-TPP formados exclusivamente por entrecruzamiento iónico presentaron una estructura más estable debido al alto grado de enlaces entre las cadenas [75].

Shu y Zhu (2000) [16] obtuvieron resultados similares al estudiar la influencia del pH de la solución de TPP sobre la liberación de FITC-dextrano en cápsulas de quitosano y TPP. El aumento del pH de la solución de TPP dio lugar a una liberación más rápida. El aumento del pH disminuye la ionización de los grupos amino del quitosano. Como resultado, la densidad de entrecruzamiento a pH básico es menor que a pH ácido, por lo que la liberación en el primer caso será más rápida [16].

Ajuste de los perfiles de liberación a modelos matemáticos

Para estudiar el mecanismo de liberación de la claritromicina, los perfiles de liberación de las microesferas entrecruzadas con TPP se ajustaron al modelo de cinética de orden cero:

$$W_0 - W_t = Kt \quad (\text{III.1})$$

donde W_0 es la cantidad de fármaco inicial y W_t el fármaco liberado a tiempo t .

Los coeficientes de correlación se alejaban demasiado de la unidad. Sin embargo, las microesferas no entrecruzadas, sí se ajustaron a una cinética de orden cero. La constante de velocidad de las microesferas sin TPP con sus respectivos coeficientes de correlación se muestran en la Tabla III.4. Como puede observarse, la constante de orden cero es significativamente menor en el caso de las microesferas con la concentración más alta de hidrocloreto de quitosano, lo que indica que la velocidad de liberación es menor en este caso.

Tabla III.4. Valores de la constante de orden cero (K) y coeficientes de correlación de los perfiles de liberación de la claritromicina de microesferas de HCS sin TPP, en SGF (pH 1,2).

HCS (% p/v)	K	R ²
0,1	32,815	0,942
0,5	32,531	0,929
1	23,511	0,906

Los perfiles de las liberaciones se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi [93]:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (\text{III.2})$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado y K_H es la constante de disolución de Higuchi.

Este modelo está inicialmente diseñado para describir la liberación de un soluto desde una superficie plana, siendo el ajuste para otras formas farmacéuticas aproximado. En este caso, los buenos ajustes obtenidos ($R^2 > 0,92$) indican que la liberación de claritromicina depende de la difusión a través de la matriz polimérica entrecruzada. En la Figura III.10 se muestra el ajuste a la ecuación de Higuchi para la formulación C3.

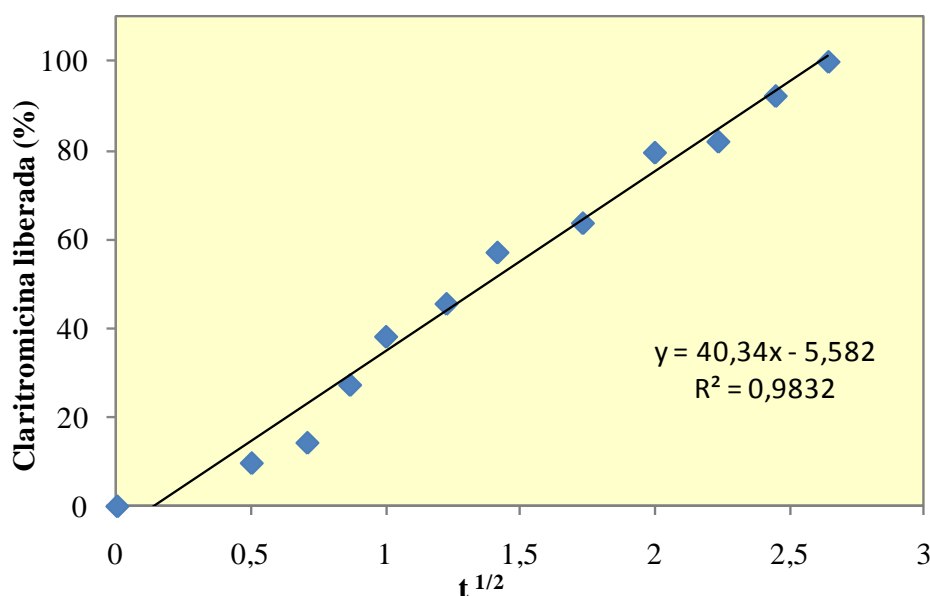


Figura III.10. Ajuste a la ecuación de Higuchi de la liberación de claritromicina de microesferas de HCS (1% p/v) entrecruzadas con TPP 0,1% (p/v) pH 4.

Con el fin de determinar el tipo de difusión, los resultados obtenidos se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas [95]:

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (\text{III.3})$$

donde M_t es cantidad de fármaco liberado a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito (por tanto, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a tiempo t), K es la constante del sistema y n es el exponente difusional.

En el caso particular de las microesferas, cuando $n = 0,43$ se trata de una difusión Fickiana, cuando $n = 0,85$ se trata de una liberación controlada por la relajación de las cadenas y cuando se obtienen valores intermedios se trata de una difusión anómala o no Fickiana, que se debe a procesos de difusión-relajación de las cadenas.

Las constantes de Higuchi, sus coeficientes de correlación, los valores obtenidos tras el ajuste de los perfiles de liberación a la ecuación de Korsmeyer-Peppas para el exponente difusional y los coeficientes de correlación se muestran en la Tabla III.5.

Tabla III.5. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de la claritromicina de microesferas de HCS en SGF (pH 1,2) a los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

Lote	Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
	K_H	R^2	n	R^2
C2	46,962	0,947	0,766	0,919
C3	40,340	0,983	0,691	0,957
C4	29,801	0,973	0,403	0,984
C5	60,753	0,972	0,687	0,955
C6	32,740	0,982	0,504	0,976
C7	30,935	0,939	0,642	0,949
C8	60,374	0,969	0,602	0,962
C9	40,788	0,957	0,517	0,935
C10	30,165	0,922	0,858	0,868
C11	29,092	0,978	0,549	0,899
C12	28,455	0,961	0,530	0,956

Como puede observarse, en general todas las formulaciones obtenidas tienen una difusión de tipo anómala o no-Fickiana que se debe a procesos de difusión-relajación de las cadenas. En el caso de la formulación C4 se trata de una difusión Fickiana y en el de C10 se trata de una liberación controlada por la relajación de las cadenas.

Los perfiles de liberación también se ajustaron al modelo de Baker-Lonsdale [98], obteniendo coeficientes de correlación altos (Tabla III.6). Estos resultados corroboran que la liberación sigue un proceso de difusión. Este modelo describe la liberación de solutos desde microcápsulas y microesferas y viene dado por la siguiente ecuación.

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (\text{III.4})$$

donde M_t es la cantidad de fármaco liberado a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco liberado a tiempo infinito y k la constante de liberación y pendiente de la recta.

Tabla III.5. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de claritromicina de las microesferas de HCS en SGF (pH 1,2) al modelo de Baker-Lonsdale.

Baker-Lonsdale		
Lote	K	R²
C2	0,092	0,914
C3	0,096	0,956
C4	0,073	0,946
C5	0,065	0,949
C6	0,065	0,969
C7	0,156	0,875
C8	0,065	0,994
C9	0,065	0,979
C10	0,049	0,977
C11	0,080	0,890
C12	0,102	0,939

1.2 Microesferas de hidrocloreuro de quitosano con claritromicina entrecruzadas con genipina

La genipina es un producto de origen natural que actualmente está ganando interés como agente entrecruzante en liberación controlada de fármacos. Reacciona con materiales que contienen grupos amino, como el quitosano, dando lugar a estructuras entrecruzadas químicamente [72].

Se prepararon microesferas de hidrocloreuro de quitosano al 0,5% (p/v) con claritromicina entrecruzadas con genipina con el objetivo de obtener sistemas de liberación controlada y determinar el efecto de este agente entrecruzante sobre la liberación del fármaco.

1.2.1 Obtención de las microesferas

En la Tabla III.7 se muestran las condiciones de preparación de las microesferas obtenidas.

Tabla III.7. Condiciones de preparación de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano (HCS) con claritromicina (CLA) y genipina (Gnp).

	HCS	CLA	Gnp
	(%) p/v	(%) p/p	(mM)
CI3	0,5	50	0,5
CI4	0,5	50	1

Se obtuvieron resultados altos tanto para el rendimiento de atomización (>55%), como para la eficiencia de encapsulación (>85%).

1.2.2 Estudios de morfología

En la Figura III.11 se observa la morfología de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano entrecruzadas con genipina 1mM. Al igual que en el caso de las microesferas entrecruzadas con TPP, las microesferas presentaron forma esférica con mellas o hundimientos producidos como consecuencia del proceso de secado durante la atomización.

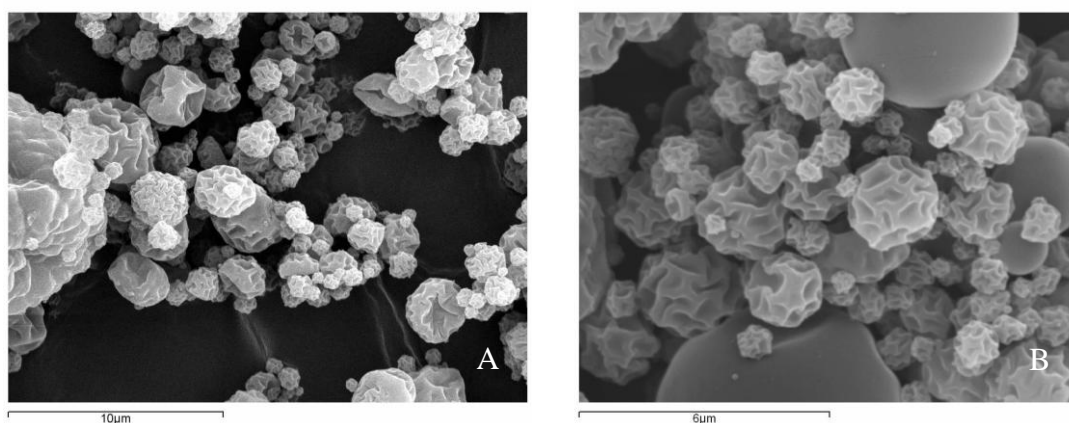


Figura III.11. Microfotografías de microesferas de HCS (0,5% p/v) con claritromicina entrecruzadas con genipina 1mM (A) y detalle de las microesferas (B).

1.2.3 Determinación de la carga superficial de las microesferas

En la Tabla III.8 se muestran los valores de potencial zeta obtenidos. Como puede observarse las microesferas presentaron un potencial zeta positivo, lo cual se debe a la presencia de hidrócloruro de quitosano en la superficie de la micropartícula. Se observaron diferencias en el valor del potencial zeta dependiendo de la concentración de genipina, aunque éstas no fueron significativas.

Tabla III.8. Valores del potencial zeta de las microesferas de HCS 0,5% (p/v) con diferentes concentraciones de genipina (Gnp).

Lote	Gnp (mM)	Potencial zeta (mV)
C13	0,5	38,6±4,10
C14	1	32,9±7,15

1.2.4 Interacción fármaco-polímero

Con objeto de estudiar la interacción del fármaco con el polímero y el agente entrecruzante en las microesferas, se realizaron estudios de difracción de rayos X. En la Figura III.12 se observa que la genipina (a) y la claritromicina (b) son sustancias cristalinas, mientras que el hidrócloruro de quitosano (c) y las microesferas presentaron una estructura amorfa (d). La genipina presentó reflexiones de cristalinidad

características a $2\theta = 10,06^\circ$; $11,98^\circ$; $16,3^\circ$; $17,26^\circ$; $18,46^\circ$; $19,34^\circ$; $22,34^\circ$; $24,1^\circ$; $25,98^\circ$; $26,22^\circ$ y $26,58^\circ$. Se deduce, por tanto, que la claritromicina se encuentra totalmente embebida en la matriz de polímero y genipina, ya que no se observa la estructura cristalina del fármaco[25, 117].

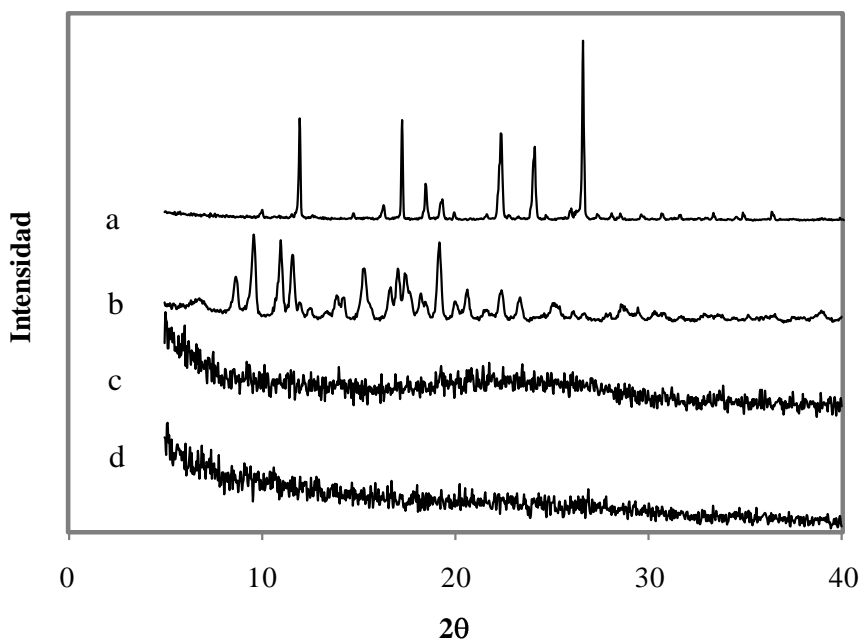


Figura III.12. Difractogramas de rayos X de: genipina (a), claritromicina (b), HCS (c) y microesferas de hidrocloreto de quitosano (0,5% p/v) con claritromicina (50% p/p) y genipina (1mM) (d).

1.2.5 Estudios de liberación *in vitro*

Los perfiles de liberación de las microesferas de hidrocloreto de quitosano entrecruzadas con genipina se muestran en la Figura III.13. Como puede observarse, las microesferas entrecruzadas con genipina 1mM (0,04% p/v) liberaron el fármaco de forma significativamente más lenta que las no entrecruzadas ($p < 0,05$). Pasadas 3 horas, las microesferas no entrecruzadas liberaron el total del fármaco encapsulado, mientras que pasado ese mismo tiempo, las microesferas con genipina liberaron un 60% aproximadamente.

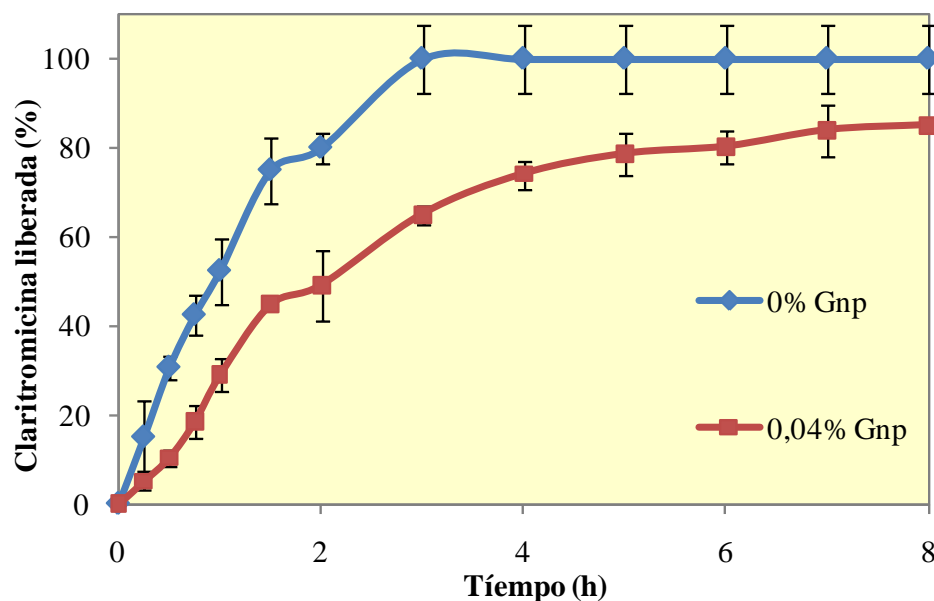


Figura III.13. Perfiles de liberación de claritromicina de microesferas de HCS 0,5% (p/v) con genipina (Gnp) 0 y 0,04% (p/v), en SGF (pH 1,2) a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Por otra parte, las microesferas entrecruzadas con genipina 0,5mM (0,02% p/v) no presentaron diferencias significativas con las entrecruzadas con genipina 1mM (0,04% p/v) ($p>0,05$). La adición de la genipina dio lugar a una reducción de la liberación, pero posiblemente sea necesario aumentar la concentración de este agente entrecruzante para observar diferencias significativas en función su concentración.

El perfil de liberación de las microesferas con genipina 0,04% (p/v) se comparó con el de las microesferas con TPP 0,1% (p/v). En la Figura III.14 se muestran los resultados obtenidos con ambos agentes entrecruzantes, TPP y Gnp. Aunque no existen diferencias significativas ($p>0,05$), la liberación de las microesferas con genipina fue más lenta que la de las microesferas con TPP, siendo la concentración de genipina inferior (0,04% p/v).

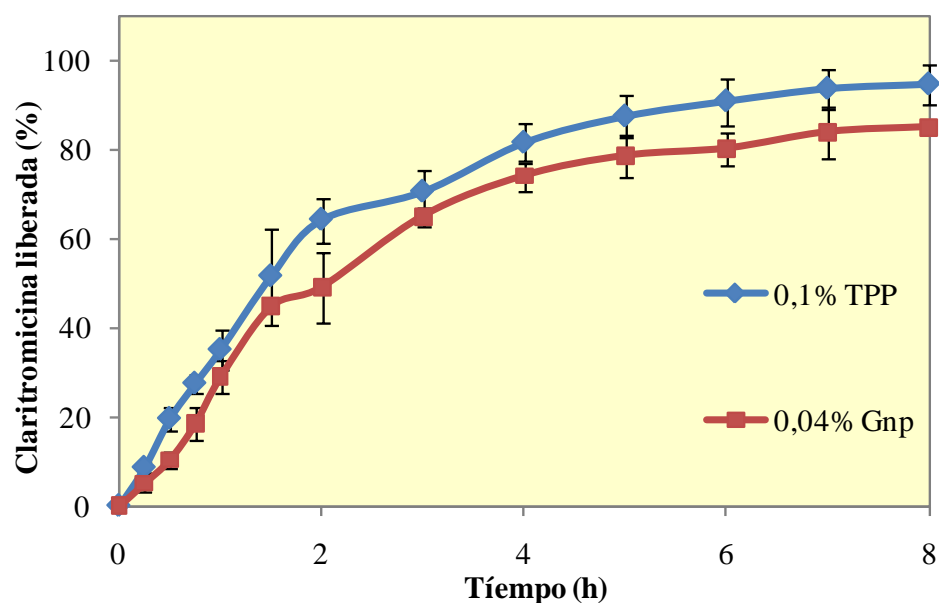


Figura III.14. Influencia del tipo de agente entrecruzante en la liberación de claritromicina de microesferas de HCS 0,5% (p/v) con TPP y Gnp, en SGF (pH 1,2) a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Los perfiles de liberación de las microesferas entrecruzadas con genipina se ajustaron al modelo de Higuchi, obteniéndose coeficientes de correlación altos ($R^2 > 0,95$). En la Figura III.15 se muestra el ajuste del perfil de liberación de las microesferas entrecruzadas con Gnp 1mM a la ecuación de Higuchi.

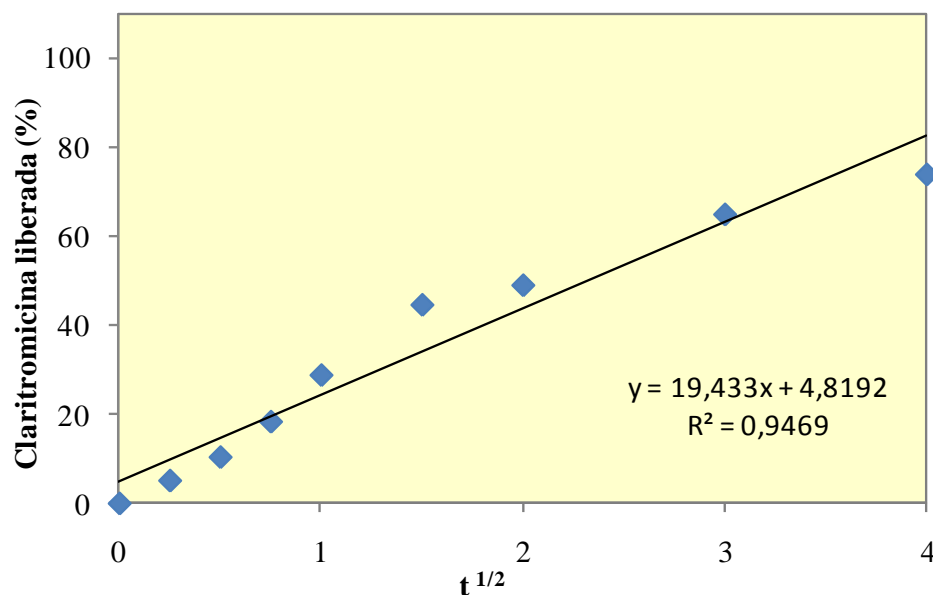


Figura III.15. Ajuste de la liberación de claritromicina de microesferas de HCS (0,5% p/v) entrecruzadas con genipina 1mM, a la ecuación de Higuchi.

Los datos obtenidos para microesferas entrecruzadas con genipina 0,5 y 1mM se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas con exponentes difusionales de 0,834 y 0,7936, respectivamente, por lo que la liberación de las microesferas se produjo por un proceso de difusión anómala o no Fickiana, aunque los valores son muy próximos a 0,85. Como se explicó en el Apartado 10 de la Introducción, para microesferas, cuando $n=0,85$ el proceso de difusión se produce por la relajación de las cadenas del polímero.

1.3 Conclusiones parciales del capítulo

De los estudios realizados para la encapsulación de claritromicina en microesferas obtenidas por atomización se puede concluir:

- El método de atomización resultó adecuado para la encapsulación de claritromicina en microesferas de hidrócloruro de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio o genipina, con alta eficiencia de encapsulación. Esto hace posible el empleo de esta técnica en la industria farmacéutica.
- El valor del potencial zeta demostró la capacidad mucoadhesiva de las microesferas obtenidas, excepto para el caso de las microesferas con hidrócloruro de quitosano 0,1% (p/v) y TPP 0,2% (p/v) a pH 9, en las que el alto grado de entrecruzamiento dio lugar a un valor de potencial zeta negativo.

- La influencia de la concentración del polímero sobre la liberación sólo fue significativa cuando no se utilizó un agente entrecruzante. Cuando se entrecizaron las microesferas con tripolifosfato sódico, una concentración más alta de quitosano no produjo necesariamente resultados más satisfactorios, por lo que se recomienda trabajar con soluciones de hidrocloreuro de quitosano de menor concentración (0,1 y 0,5% p/v).
- La velocidad de liberación de claritromicina disminuyó para las formulaciones que incorporaron tripolifosfato sódico o genipina como agentes entrecruzantes. Se alcanzó un grado de entrecruzamiento óptimo en ambos casos.
- Los perfiles de liberación del principio activo se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi, con un mecanismo de difusión a través de la matriz polimérica.

2 Microesferas de hidrocloreto de quitosano con hidrocloreto de tramadol obtenidas por atomización

El hidrocloreto de tramadol, es un principio activo altamente hidrofílico. Esta característica influye en la encapsulación del fármaco en una matriz polimérica hidrosoluble como el quitosano y en su posterior liberación. Al poner en contacto el sistema con el medio de liberación se produce una difusión rápida del fármaco hacia el exterior, provocando un “efecto estallido” al inicio de la liberación.

Existen diferentes agentes entrecruzantes que han sido utilizados para modular la liberación de fármacos a partir de sistemas a base de polímeros biodegradables como el quitosano, como son el glutaraldehído, el tripolifosfato, el etilenglicol o el diisocianato. En estudios anteriores, se ha visto que la liberación de hidrocloreto de tramadol de microesferas de quitosano y TPP presenta igualmente un efecto estallido al inicio de la liberación [5]. Además, los agentes entrecruzantes sintéticos presentan cierta toxicidad. Por ello, en este caso se ha abordado el uso de un agente entrecruzante de origen natural, la genipina, puesto que presenta baja citotoxicidad y da lugar a productos entrecruzados estables y biocompatibles [72].

El objetivo de este capítulo ha sido la obtención de microesferas de hidrocloreto de quitosano entrecruzadas con genipina para la encapsulación de hidrocloreto de tramadol. Las microesferas obtenidas se caracterizaron en términos de morfología, potencial zeta e interacción fármaco-polímero. Así mismo, se estudió la influencia de dos variables sobre la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado: la concentración de genipina y el tiempo de la reacción de entrecruzamiento.

2.1 Reacción de entrecruzamiento del hidrocloreto de quitosano y la genipina

La reacción de la genipina con el hidrocloreto de quitosano es una reacción que produce un aumento de la viscosidad de la solución resultante en función del tiempo, dando lugar a un hidrogel elástico. Se estudió el efecto de tres variables sobre la reacción de entrecruzamiento: el tiempo de reacción, la concentración de genipina y la temperatura de reacción. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por espectrofotometría UV-visible.

En la Figura III.16 se muestra el espectro UV-vis de la genipina pura en el medio de disolución (agua destilada). A partir de éste se determinó que la máxima absorción de la genipina se produce a una longitud de onda de 240nm.

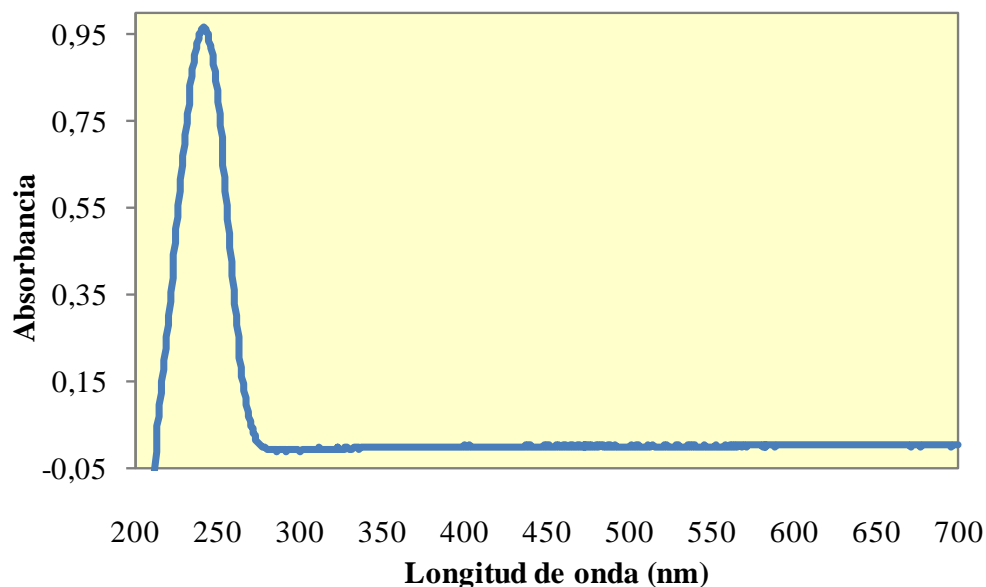


Figura III.16. Espectro UV-Vis ($\lambda = 200\text{-}700\text{nm}$) de una solución de Gnp 2mM en el medio de disolución a 25°C.

En las Figuras III.17, III.18 y III.19 se muestran los espectros UV-vis de las soluciones de hidrocloreto de quitosano y genipina respecto a las tres variables experimentales: tiempo de reacción, concentración de genipina y temperatura de entrecruzamiento, respectivamente.

Con el incremento del tiempo de reacción (Figura III.17) entre el hidrocloreto de quitosano y la genipina, se produjo una disminución en el pico de 240nm, máximo de absorción característico de la genipina. Además, apareció un nuevo pico de absorción a 290nm, que aumentó con el tiempo de entrecruzamiento. La disminución de la absorbancia a 240nm se debe a la conversión del grupo éster de la genipina en el enlace amida [122]. Por otra parte, el aumento de la absorción a 290nm se atribuye a la formación de un compuesto heterocíclico de la genipina y el hidrocloreto de quitosano [123]. Como se explicó en el Capítulo de Introducción, durante el entrecruzamiento entre la genipina y el quitosano se producen dos reacciones separadas. El ataque nucleofílico por parte de los grupos amino del quitosano sobre el carbono 3 de la genipina da lugar a la formación de un compuesto heterocíclico de la genipina unida al

residuo de glucosamina en el quitosano. A la formación de dicho compuesto se le atribuye el pico de absorción a 290nm. Por otra parte, a la sustitución nucleofílica del grupo ester de la genipina, formándose un enlace amida con el quitosano, se le atribuye la disminución del máximo de absorción a 240nm y se trata de una reacción más lenta. Esto queda demostrado en el espectro UV-vis obtenido, donde el máximo de absorción a 240nm disminuye lentamente con el tiempo, mientras que el máximo a 290nm aumenta significativamente con el tiempo de reacción.

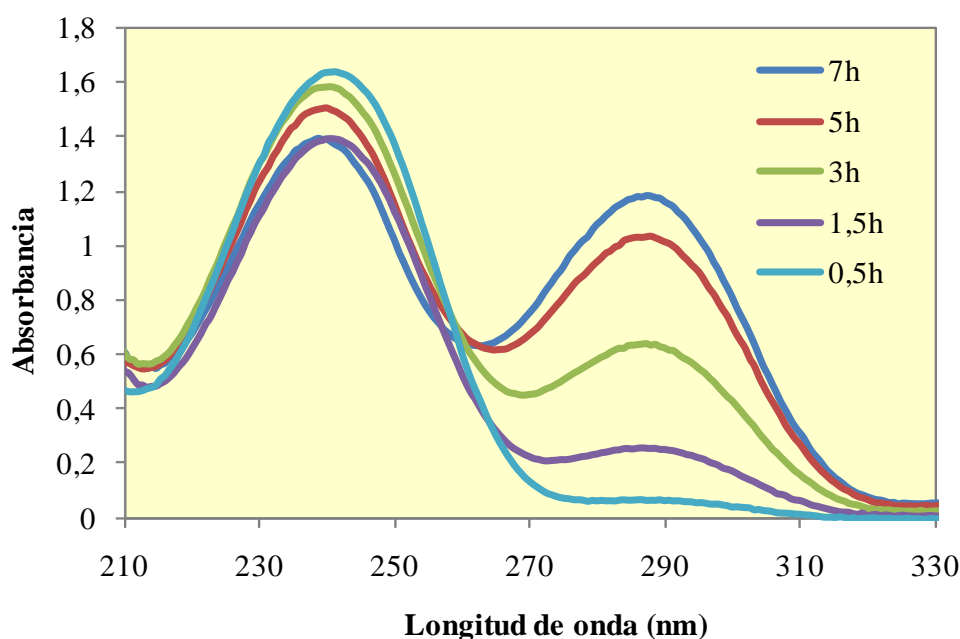


Figura III.17. Evolución del espectro UV-vis ($\lambda = 210-330\text{nm}$) de una solución de HCS 0,5% (p/v) y Gnp 5mM, a 50°C, en función del tiempo de reacción (0,5h-7h).

La intensidad de la absorción a 290nm también aumentó con la concentración de genipina (Figura III.18) y la temperatura de reacción (Figura III.19). La presencia de esta banda de absorción y su incremento es, por tanto, un indicador del grado de entrecruzamiento entre el hidrocloreuro de quitosano y la genipina.

Las soluciones entrecruzadas presentaron además una coloración azul, cuya intensidad aumentó con el tiempo de reacción y la concentración de genipina. La coloración azul indica por tanto la presencia de entrecruzamiento y se atribuye a la polimerización de la genipina en presencia de oxígeno así como a la reacción con el quitosano [77]. El hecho de que la coloración azul apareciese primero en la superficie de la muestra en contacto con el aire y después se distribuyera por el resto de la solución o gel apoya esta hipótesis.

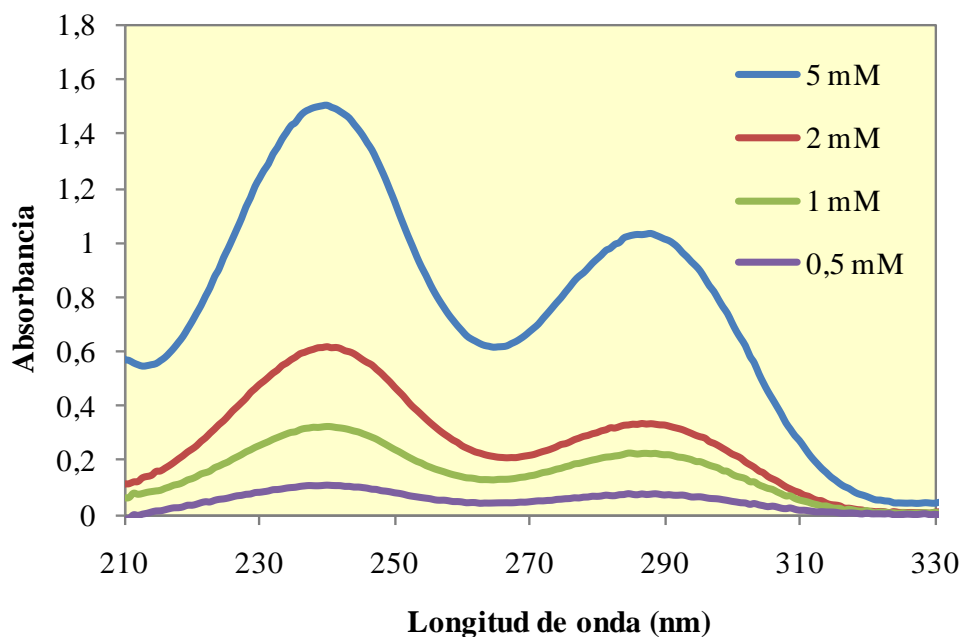


Figura III.18. Espectros UV-vis ($\lambda = 210\text{-}330\text{nm}$) de soluciones de HCS (0,5% p/v) a diferentes concentraciones de Gnp (0,5-5mM) entrecruzados a 50°C durante 5 horas.

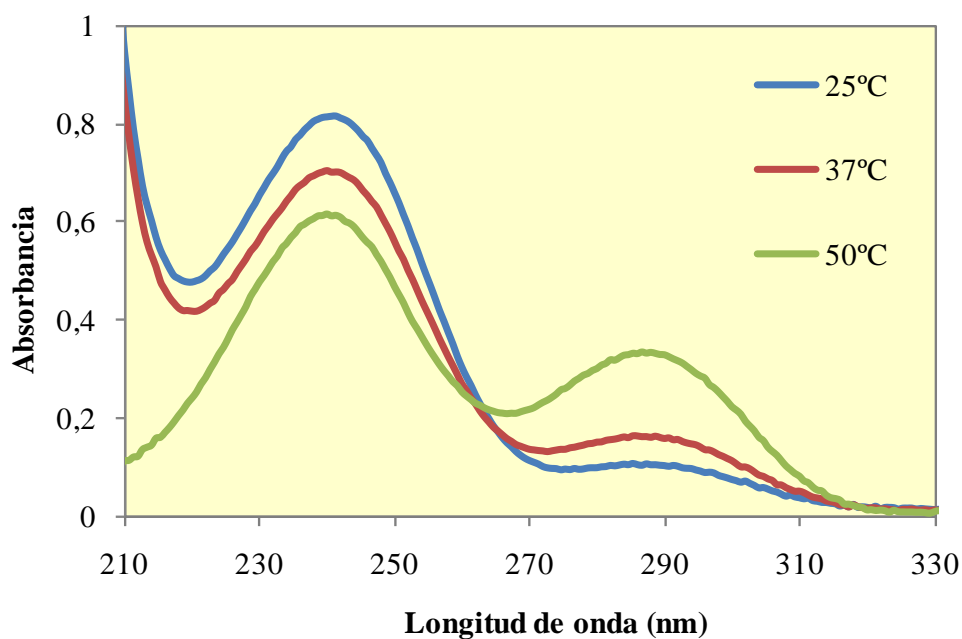


Figura III.19. Espectros UV-vis ($\lambda = 210\text{-}330\text{nm}$) de soluciones de HCS 0,5% (p/v) y Gnp 2mM entrecruzados a diferentes temperaturas de entrecruzamiento (25°C , 37°C y 50°C) durante 5h.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los parámetros más adecuados para la preparación de microesferas entrecruzadas con genipina por el método de atomización. A tiempos cortos de reacción no se observaron diferencias significativas en el espectro de absorción, por lo que se seleccionó como tiempo de reacción las 5

horas. En cuanto a la concentración de genipina, las concentraciones de 2 y 5mM, después de 5 horas de reacción, produjeron un cambio significativo sobre la intensidad de los máximos de absorción descritos. La temperatura seleccionada fue de 50°C, puesto que aceleró de forma significativa la reacción de entrecruzamiento y es una temperatura a la que son estables los compuestos utilizados.

2.2 Determinación del grado de entrecruzamiento

El grado de entrecruzamiento de las soluciones de hidrocloreuro de quitosano y genipina se calculó determinando la cantidad de grupos amino libres del quitosano después de la reacción. La absorbancia, a una longitud de onda de 570nm, en función de la concentración de grupos amino de la glucosamina se representa en la Figura III.20.

En la Tabla III.9 se muestra el grado de entrecruzamiento de las soluciones de hidrocloreuro de quitosano con diferentes concentraciones de genipina (2, 5 y 20mM). El grado de entrecruzamiento (G) se calculó tomando como referencia la cantidad de grupos amino libres en las microesferas sin genipina, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% G = [(NH_2 \text{ inicial} - NH_2 \text{ final}) / NH_2 \text{ inicial}] \times 100 \quad (III.5)$$

donde $NH_2 \text{ inicial}$ es la cantidad de grupos amino libres en la muestra sin entrecruzar y $NH_2 \text{ final}$ es la cantidad de grupos amino libres en las muestras entrecruzadas.

Como puede observarse el grado de entrecruzamiento disminuye conforme aumenta la concentración de genipina.

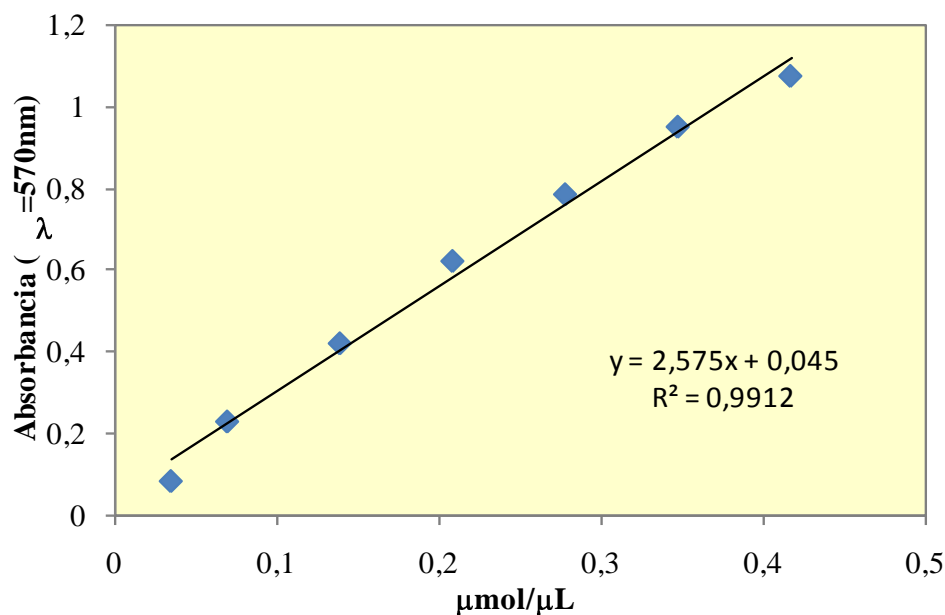


Figura III.20. Curva de calibrado que relaciona la absorbancia ($\lambda=570\text{nm}$) de la glucosamina con la concentración de grupos amino ($\mu\text{mol NH}_2/\mu\text{l}$ solución).

Tabla III.9. Grado de entrecruzamiento de las soluciones de HCS 0,5% (p/v) entrecruzadas durante 5h a 50°C con diferentes concentraciones de genipina (2, 5 y 20mM).

Genipina (mM)	Grado entrecruzamiento (%)
0	0
2	14,25 \pm 2,49
5	23,38 \pm 0,077
20	29,64 \pm 4,21

Otros autores obtuvieron un grado de entrecruzamiento máximo de 33-34% para microesferas sumergidas en una solución de genipina 0,5mM durante 8 y 16 horas o en soluciones 1 y 2mM durante 4 horas[86]. Las microesferas entrecruzadas con genipina 0,5mM durante 4 horas presentaron un grado de entrecruzamiento menor, de alrededor del 24%. Con mayores concentraciones de genipina no obtuvieron grados de entrecruzamiento más altos.

En este trabajo, el máximo grado de entrecruzamiento fue un 29% y se obtuvo al entrecruzar la solución de hidrocloreto de quitosano 0,5% (p/v) con genipina 20mM durante 5 horas. Estos resultados no son comparables a los de otros autores, puesto que, las condiciones experimentales son distintas; se han empleado distintos quitosanos y en el trabajo que se presenta la solución de hidrocloreto de quitosano se entrecruzó antes de la formación de las microesferas. Además se emplearon distintas condiciones de tiempo de reacción y concentración de genipina.

2.3 Obtención de las microesferas

La Tabla III.10 muestra las características de las microesferas obtenidas por atomización con las diferentes concentraciones de genipina utilizadas y dos tiempos de entrecruzamiento distintos. Hay que destacar, que además de las variables experimentales seleccionadas a partir de los estudios de espectrofotometría UV-VIS, se utilizó un tiempo de reacción de entrecruzamiento más alto (15h) para las microesferas con genipina 2mM y una concentración más alta de genipina (20mM). Se eligió este tiempo y esta concentración mucho más alta con el objetivo de ver si estas condiciones afectarían significativamente a la liberación de tramadol.

Tabla III.10. Condiciones de preparación de las microesferas de hidrocloreto de quitosano (HCS) cargadas con tramadol (TRA) y entrecruzadas con genipina (Gnp).

Lote	HCS (% p/v)	TRA (% p/p)	Gnp (mM)	Tiempo* (h)
T1	0,5	---	---	---
T2	0,5	30	---	---
T3	0,5	30	2	5
T4	0,5	30	2	15
T5	0,5	30	5	5
T6	0,5	30	20	5

* Tiempo de entrecruzamiento

En la Tabla III.11 se muestra el rendimiento de atomización y la eficiencia de encapsulación de los lotes preparados.

El rendimiento del proceso de atomización fue relativamente alto, entre 60 y 70%, excepto en el caso de las microesferas del lote T6, cuya solución presentó una alta viscosidad y parte de la muestra se perdió en el ciclón.

La eficiencia de encapsulación de las microesferas en todos los casos resultó alta, cercana a un 100%.

Tabla III.11. Rendimiento de atomización (RA) y eficiencia de encapsulación (EE) (media \pm SD) de las microesferas obtenidas.

Lote	RA (%)	EE (%)
T1	68,52	---
T2	61,43	96,27 \pm 3,49
T3	67,19	97,77 \pm 4,29
T4	62,12	99,83 \pm 1,01
T5	67,57	99,69 \pm 3,12
T6	45,15	95,29 \pm 2,98

2.4 Estudios de morfología

La morfología de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano cargadas con hidrocloreuro de tramadol y entrecruzadas con genipina 2 y 20mM se puede observar en la Figura III.21. Las microesferas presentaron forma esférica, mostrando hundimientos debidos al proceso de atomización. Al entrecruzar aumentando las concentraciones de genipina, se obtuvieron microesferas menos colapsadas. Por lo tanto, el entrecruzamiento con una mayor concentración de genipina aumentó la rigidez de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano.

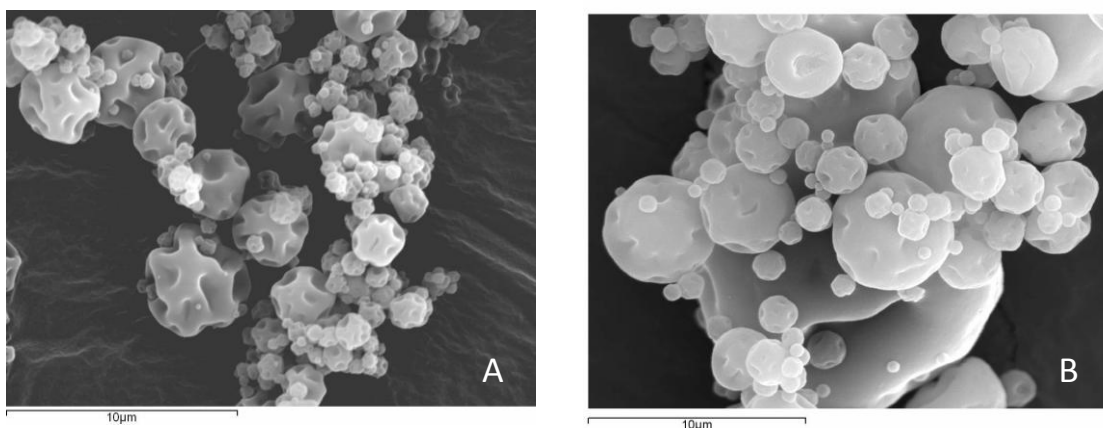


Figura III.21. Microfotografías de SEM de microesferas de HCS 0,5% (p/v) cargadas con hidrocloreuro de tramadol y entrecruzadas con Gnp 2mM (A) y 20mM (B) durante 5 horas a 50°C.

2.5 Determinación de la carga superficial de las microesferas

En la Tabla III.12 se resumen los resultados obtenidos en la determinación del potencial zeta de las microesferas. Como puede observarse, los valores de potencial zeta se mantuvieron positivos en todos los casos. Esto indica la presencia de grupos amino del hidrocloreuro de quitosano en la superficie de las microesferas, lo que es beneficioso para mantener las propiedades mucoadhesivas y promotoras de absorción del quitosano[124].

El valor del potencial zeta de las microesferas disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al añadir la genipina, lo cual es indicativo de la disminución de grupos amino libres y, por tanto, de entrecruzamiento. Las microesferas obtenidas con una concentración 20mM de genipina mostraron un potencial zeta significativamente más bajo que las microesferas con concentraciones más bajas. El efecto del tiempo de entrecruzamiento sobre la carga externa se estudió para las microesferas con genipina 2mM. No se observaron diferencias significativas entre las microesferas entrecruzadas durante 5 y 15 horas.

Tabla III.12. Valores del potencial zeta (media \pm SD) de las microesferas de HCS (0,5% p/v) e hidrocloreuro de tramadol (30% p/p) en función de la concentración de genipina (2-20mM) y del tiempo de entrecruzamiento (5 y 15h).

Lote	Genipina (mM)	Tiempo (h)	Potencial zeta (mV)
T1*	---	---	32,7 \pm 3,85
T2	---	---	24,6 \pm 3,15
T3	2	5	14,84 \pm 1,06
T4	2	15	15,92 \pm 1,06
T5	5	5	14,50 \pm 0,46
T6	20	5	12,24 \pm 0,45

*No contiene hidrocloreuro de tramadol

2.6 Interacción fármaco-polímero

Se realizaron estudios de difracción de rayos X para determinar el grado de cristalinidad del fármaco en las microesferas. Como puede observarse en los difractogramas de la Figura III.22, la genipina (a) y el hidrocloreuro de tramadol (b) son sustancias cristalinas, mientras que el hidrocloreuro de quitosano (c) tiene una estructura amorfa. El tramadol presenta reflexiones de cristalinidad a valores de $2\theta = 10,42^\circ; 13,02^\circ; 15,38^\circ; 16,7^\circ; 18,5^\circ; 20,58^\circ; 21,58^\circ; 24,46^\circ; 26,18^\circ$ y $30,94^\circ$. Por otra parte, la genipina presenta reflexiones de cristalinidad a valores de $2\theta = 10,06^\circ; 11,98^\circ; 16,3^\circ; 17,26^\circ; 18,46^\circ; 19,34^\circ; 22,34^\circ; 24,1^\circ; 25,98^\circ; 26,22^\circ$ y $26,58^\circ$.

En la Figura III.23 se muestra el difractograma de las microesferas (d) de hidrocloreuro de quitosano (0,5% p/v), tramadol (30% p/p) y genipina (2mM) y el de la mezcla física (e) con los tres componentes en las mismas proporciones que en las microesferas. El difractograma de las microesferas de hidrocloreuro de quitosano y genipina con tramadol presenta baja cristalinidad, lo cual indica la incorporación del hidrocloreuro de tramadol en la matriz polimérica en forma de dispersión molecular [25, 117]. El fármaco está embebido completamente en la matriz de hidrocloreuro de quitosano entrecruzada con genipina y la reacción entre estos dos últimos fue completa, lo cual favorece la

liberación retardada. Sin embargo, la mezcla física presenta reflexiones de cristalinidad aportada por el tramadol y la genipina, mostrando que no existe interacción entre los componentes mezclados.

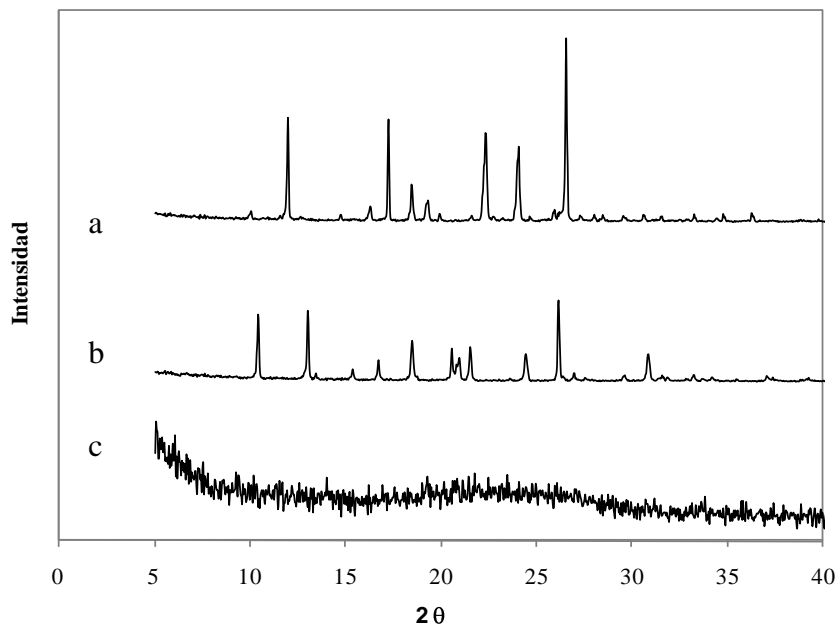


Figura III.22. Difractogramas de rayos X de la genipina (a), el hidrocloreuro de tramadol (b) y del hidrocloreuro de quitosano (b)

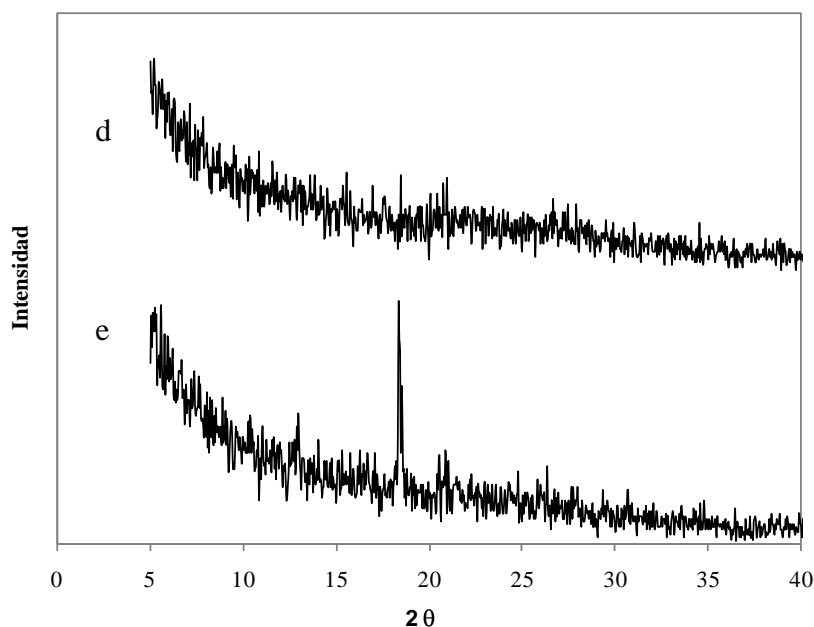


Figura III.23. Difractogramas de rayos X de las microesferas (d) de hidrocloreuro de quitosano (0,5% p/v) con genipina (2mM) y tramadol (30% p/p) y de la mezcla física (e) de hidrocloreuro de quitosano, genipina y tramadol .

2.7 Estudios de liberación *in vitro*

Los estudios de liberación se realizaron en medio gástrico simulado y medio intestinal simulado puesto que el hidrocloreuro de tramadol se administra por vía oral y su absorción se produce en el intestino. Se estudió el efecto de dos variables sobre la liberación:

- La concentración de genipina
- El tiempo de entrecruzamiento

Efecto de la concentración de genipina sobre la liberación in vitro

En las Figuras III.24 y III.25 se muestran los perfiles de liberación en SGF y SIF de hidrocloreuro de tramadol de las microesferas con diferentes concentraciones de genipina (0-20mM).

En SGF (Figura III.24), la disminución de fármaco liberado sólo fue significativa ($p < 0,05$) durante todo el tiempo de la liberación en el caso de las microesferas con genipina 5 y 20mM. Durante los primeros 30 minutos del experimento, se liberó un 65% del tramadol encapsulado de las microesferas sin genipina. Las microesferas preparadas con genipina 2, 5 y 20mM, redujeron significativamente la cantidad de fármaco liberado en esos primeros 30 minutos ($p < 0,05$) con respecto a las no entrecruzadas, liberándose un 48, 39 y 41% de fármaco, respectivamente. Las microesferas no entrecruzadas liberaron todo el fármaco encapsulado a las 2 horas de liberación, las entrecruzadas con genipina 2mM a las 3 horas y con genipina 5 y 20mM, a las 4 horas. Por lo tanto, estas microesferas retardaron la liberación 2 horas con respecto a las primeras. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los perfiles de liberación de las microesferas entrecruzadas con genipina 5 y 20mM.

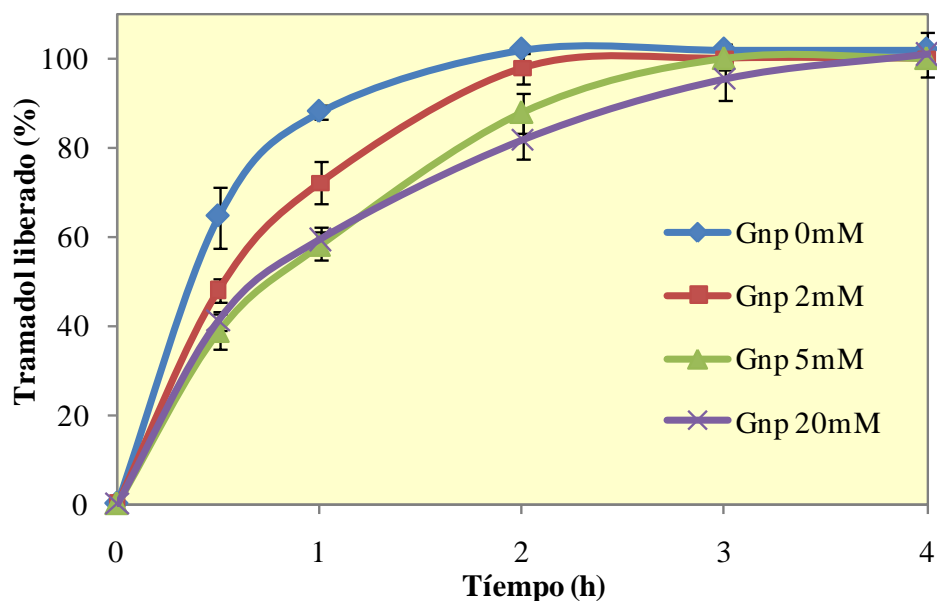


Figura III.24. Influencia del grado de entrecruzamiento en la liberación de tramadol de microesferas de HCS 0,5% (p/v) con genipina (Gnp) a diferentes concentraciones (0-20mM) en SGF (pH 1,2), a 37°C y 100rpm de agitación (n=3; \pm SD).

En SIF (Figura III.25.), las microesferas sin genipina liberaron un 55% del fármaco encapsulado en la primera media hora, mientras que la liberación a este mismo tiempo de las microesferas con genipina fue significativamente menor ($p < 0,05$). La cantidad de tramadol liberado sólo fue significativamente menor durante todo el experimento en el caso de las microesferas entrecruzadas con la concentración más alta de genipina, 20mM. El total del fármaco encapsulado fue liberado por las microesferas sin genipina y con concentraciones 2 y 5mM de genipina pasadas 3 horas, mientras que las entrecruzadas con una concentración 20mM de genipina liberaron el fármaco después de 4 horas.

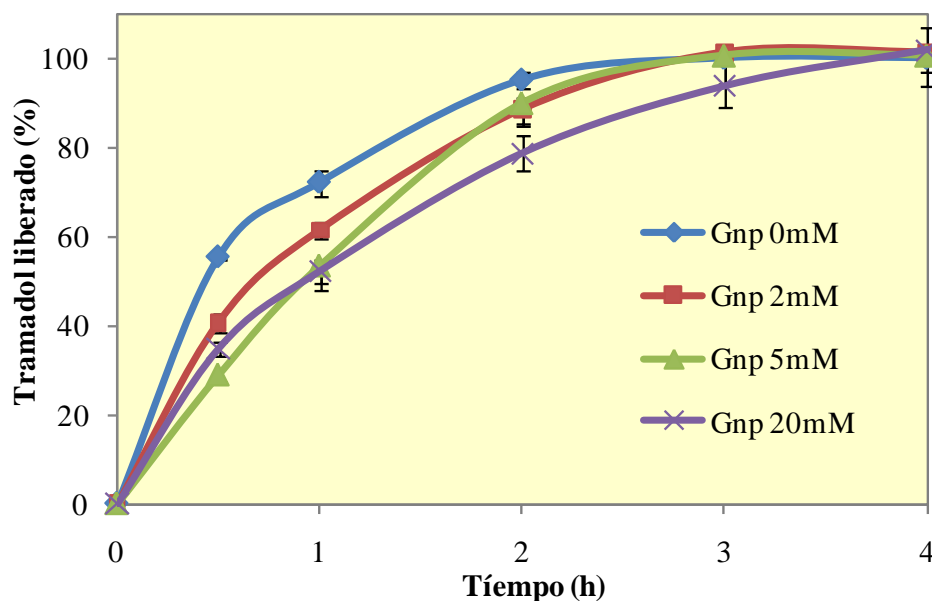


Figura III.25. Influencia del grado de entrecruzamiento en la liberación de tramadol de microesferas de HCS 0,5% (p/v) con genipina (Gnp) a diferentes concentraciones (0-20mM) en SIF (pH 7,4), a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Los resultados obtenidos muestran que la genipina retarda la liberación de hidrocloreto de tramadol. Los resultados descritos por Paños *et al.* (2007) [5] muestran un efecto estallido en los primeros momentos de la liberación de este fármaco en microesferas de quitosano entrecruzadas con TPP. Con TPP 0,5% (p/v) se liberó cerca de un 80% de tramadol en los primeros 20 minutos en SIF.

Se compararon los perfiles de liberación de las microesferas en SGF y SIF. Como puede observarse en la Figura III.26, las microesferas de hidrocloreto de quitosano sin genipina presentaron una liberación más lenta de tramadol en SIF que en SGF, siendo las diferencias significativas entre 0,5 y 2 horas ($p < 0,05$). Esto se debe a la disolución del hidrocloreto de quitosano a pH gástrico, que provoca una rápida liberación del principio activo encapsulado.

De las concentraciones de genipina estudiadas, las más altas, 5 y 20mM, le confirieron mayor resistencia a las microesferas a la degradación en medio ácido. Como se observa en la Figura III.27, al entrecruzar las microesferas con genipina 20mM, disminuyó la liberación de tramadol en SGF y los perfiles de liberación en ambos medios (SGF y SIF) fueron similares. Esto ocurre porque el entrecruzamiento con concentraciones más

altas de genipina disminuye la cantidad de grupos amino libres y, por tanto, la liberación a pH ácido.

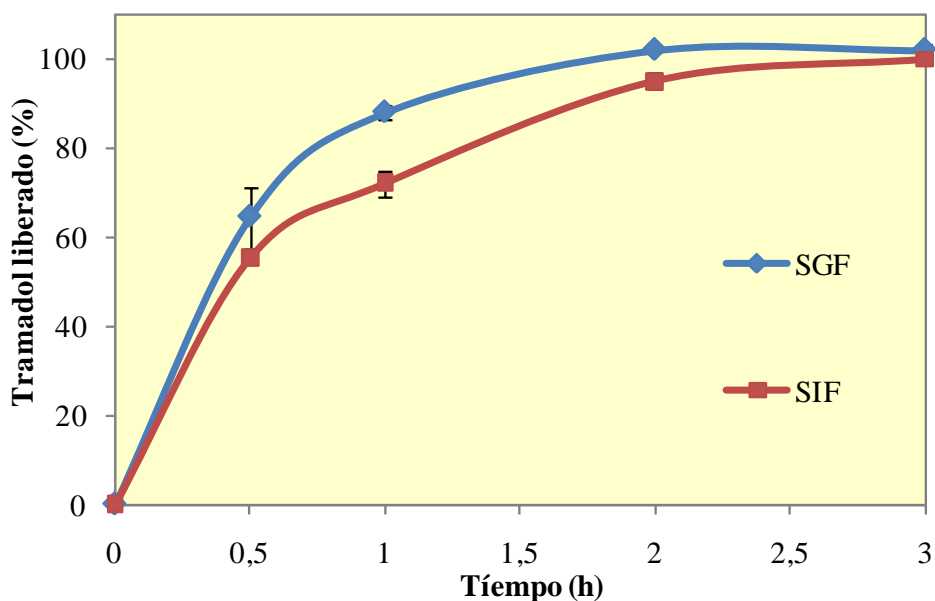


Figura III.26. Influencia del pH del medio de liberación, SGF y SIF (pH 1,2 y 7,4 respectivamente), en la liberación de tramadol de microesferas de HCS 0,5% (p/v) no entrecruzadas, a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

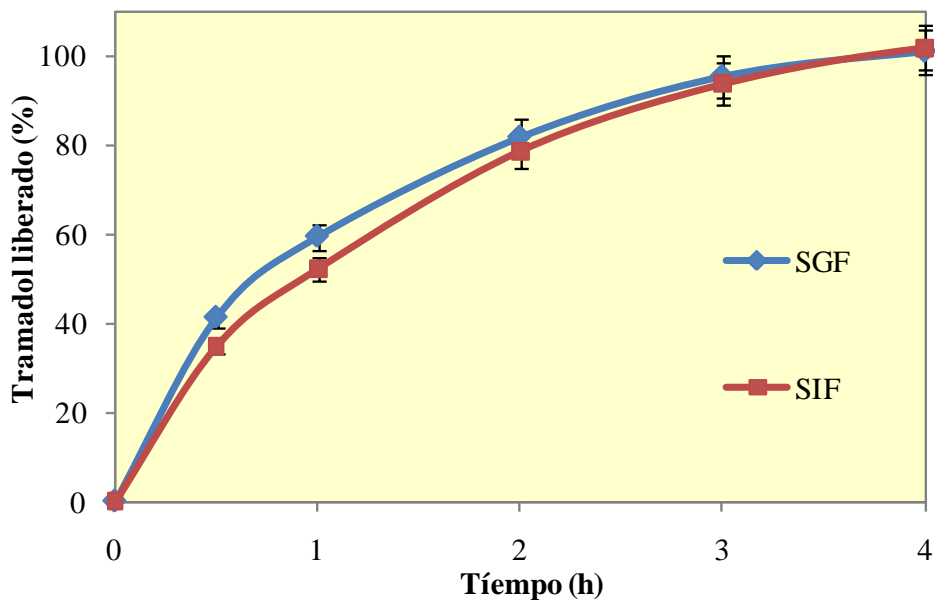


Figura III.27. Influencia del pH del medio de liberación, SGF y SIF (pH 1,2 y 7,4 respectivamente), en la liberación de tramadol de microesferas de HCS 0,5% (p/v) entrecruzadas con genipina 20mM, a 37°C y 100 rpm de agitación (n=3; \pm SD).

Efecto del tiempo de entrecruzamiento

El estudio del efecto del tiempo de entrecruzamiento (0-15h) se llevó a cabo a una concentración 2mM de genipina. Las microesferas sin genipina se consideraron el tiempo cero (0h). La liberación de las microesferas se realizó en SGF y SIF. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras III.28 y III.29 respectivamente.

Como puede observarse en la Figura III.28, las microesferas sin genipina liberaron más del 80% del tramadol en 1 hora, mientras que las entrecruzadas con una concentración 2mM de genipina durante 5 y 15 horas, liberaron el 72 y el 60%, respectivamente, cantidades significativamente inferiores ($p < 0,05$). El 100% del tramadol encapsulado fue liberado a las 2 horas de las microesferas sin entrecruzar y de las entrecruzadas durante un período de 5 horas, mientras que las que fueron sometidas a un entrecruzamiento durante un período de 15 horas lo liberaron pasadas 3 horas.

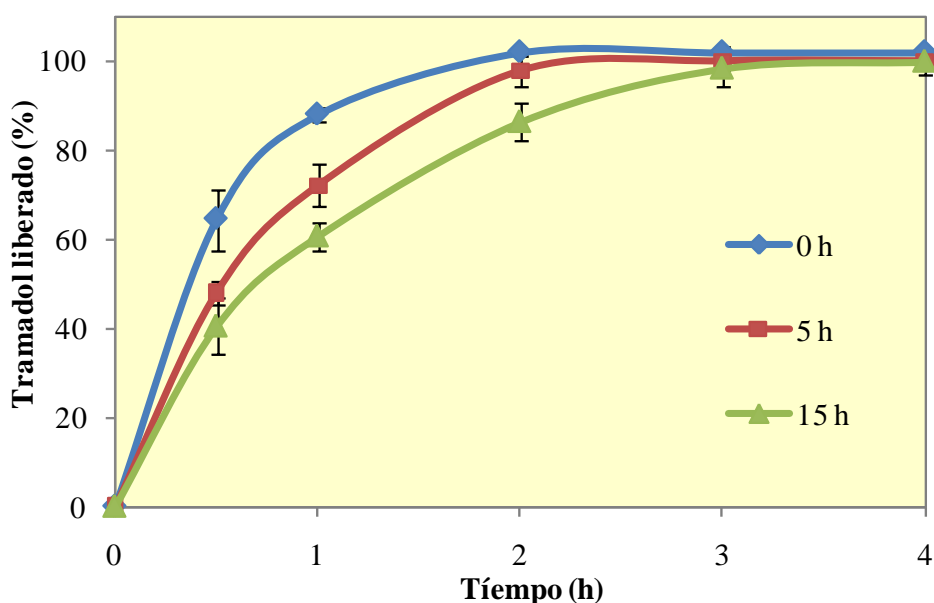


Figure III.28. Influencia del tiempo de entrecruzamiento (0-15h) en la liberación *in vitro* de tramadol en SGF (pH 1,2) de microesferas de HCS 0,5% (p/v) entrecruzadas con genipina 2mM ($n=3$; \pm SD).

En medio SIF, la liberación de tramadol de las microesferas entrecruzadas durante 5 y 15h horas fue más baja que la de microesferas no entrecruzadas. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en todo el rango de tiempo estudiado para tiempos de entrecruzamiento de 5 y 15 horas.

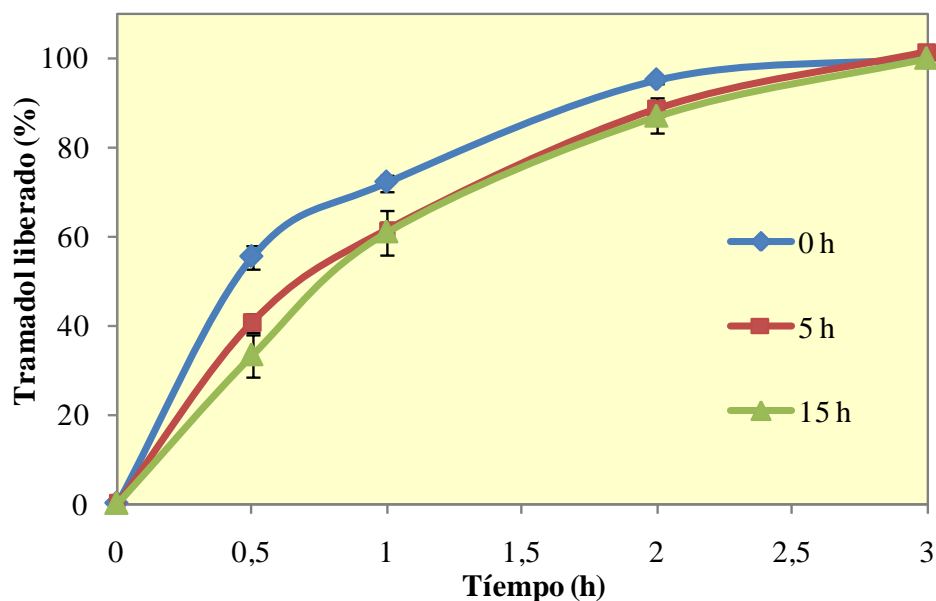


Figura III.29. Influencia del tiempo de entrecruzamiento en la liberación *in vitro* de tramadol en SIF (pH 7,4) de microesferas entrecruzadas con genipina 2mM durante un período de 5 y 15h (n=3; \pm SD).

Existen pocos estudios sobre la preparación de microesferas de quitosano entrecruzadas con genipina. Yuan *et al.* (2007) obtuvieron microesferas de quitosano y genipina para la encapsulación de albúmina bovina. Observaron que el grado de entrecruzamiento de las microesferas y su tasa de hinchamiento aumentó con el tiempo de entrecruzamiento y la concentración de genipina. Además, la liberación de albúmina se produjo de forma más lenta que en el caso de microesferas sin genipina.

Mi *et al.* (2001) prepararon microesferas para la encapsulación de indometacina por un método de dispersión agua en aceite, utilizando genipina como agente entrecruzante. En este caso, el tiempo de entrecruzamiento también influyó en la liberación.

Ajuste de los perfiles de liberación a modelos matemáticos

Los perfiles de liberación obtenidos en este apartado se ajustaron a varios modelos matemáticos descritos para estos sistemas. La liberación de hidrocloreto de tramadol resultó ser bifásica, diferenciándose dos etapas: una primera en la que la liberación es más rápida, y una segunda en la que ya se ha liberado casi todo el fármaco y aumenta la liberación sólo ligeramente. En general, el punto de inflexión entre las dos etapas se encuentra a 1 hora de liberación. Por tanto, los perfiles de liberación no se ajustaron a la cinética de orden cero; los coeficientes de correlación obtenidos se alejaban demasiado de la unidad.

Los perfiles de liberación se ajustaron bien al modelo de Higuchi [93], cuya ecuación se muestra a continuación.

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (\text{III.2})$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado y K_H es la constante de disolución de Higuchi, que describe la liberación por un proceso de difusión basado en la ley de Fick.

En la Tabla III.13 se muestran los valores de las constantes de Higuchi obtenidas con sus respectivos coeficientes de correlación en ambos medios, SGF y SIF. Como puede observarse,

Tabla III.13. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de hidrocóloro de tramadol de microesferas de HCS en SGF y SIF al modelo de Higuchi.

Lote	SGF		SIF	
	K_H	R^2	K_H	R^2
T2	74,511	0,965	59,477	0,966
T3	63,088	0,981	60,087	0,996
T4	53,843	0,983	60,211	0,981
T5	60,414	0,998	61,762	0,973
T6	51,930	0,987	53,010	0,995

Los resultados indican, por tanto, que la liberación del principio activo de las microesferas sigue un mecanismo de difusión. En la Figura III.30 se muestra el ajuste de las microesferas con HCS 0,5% (p/v) entrecruzadas con genipina 20mM (T6) a la ecuación de Higuchi:

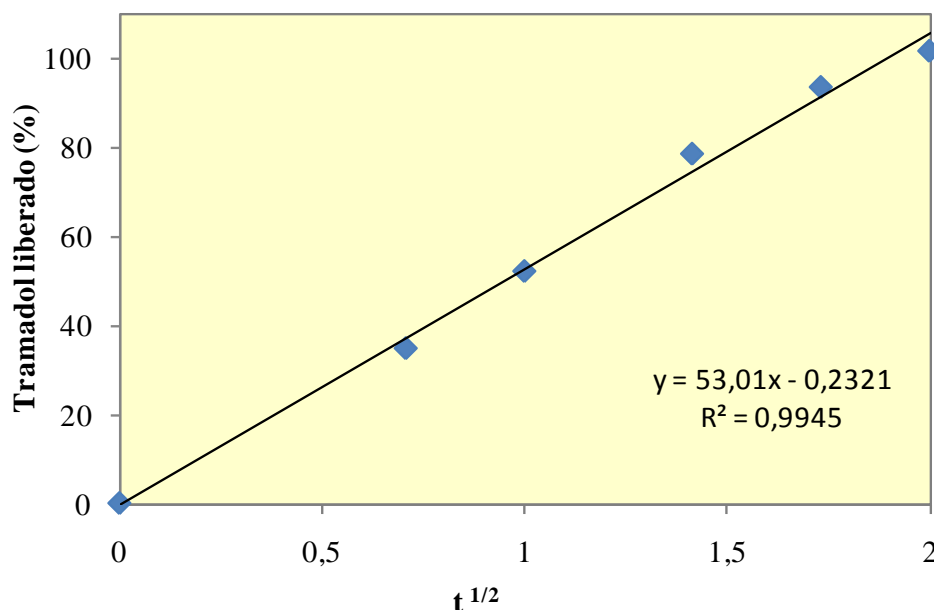


Figura III.30. Ajuste a la ecuación de Higuchi de la liberación de hidrocóloro de tramadol en SIF (pH 7,4) de microesferas de HCS 0,5% (p/v) entrecruzadas con Gnp 20mM.

Una vez conocido el mecanismo de liberación, se determinó el tipo de difusión, tanto en medio SGF como SIF, ajustando los datos a la ecuación de Korsmeyer-Peppas [95].

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (\text{III.3})$$

donde M_t es cantidad de fármaco liberado a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito, K es la constante del sistema y n es el exponente difusional.

Los valores obtenidos para el exponente difusional (n) se muestran en la Tabla III.14. Los resultados obtenidos indican que las formulaciones presentaron diferentes comportamientos dependiendo del pH del medio y de la presencia o no de genipina. En SGF, las microesferas sin entrecruzar y entrecruzadas con genipina 2mM presentaron un mecanismo de difusión Fickiana, mientras que las microesferas entrecruzadas con genipina de mayor concentración (5 y 20mM) mostraron una liberación por difusión anómala. En SIF, sólo las microesferas no entrecruzadas presentaron una difusión Fickiana. En el caso de las formulaciones entrecruzadas, la difusión resultó anómala.

Stulzer *et al.* (2009) observaron diferencias en el mecanismo de liberación de aciclovir desde microesferas de quitosano con TPP. En condiciones ácidas (pH 1,2) la liberación

correspondía a una cinética de difusión no-Fickiana, mientras que a pH 6,8 mostraron una liberación Fickiana [115].

Tabla III.14. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de hidrocloreuro de tramadol de microesferas de HCS en SGF y SIF al modelo de Korsmeyer-Peppas.

Lote	SGF		SIF	
	n	R ²	n	R ²
T2	0,330	0,959	0,346	0,983
T3	0,353	0,962	0,515	0,992
T4	0,395	0,969	0,675	0,977
T5	0,531	0,989	0,714	0,977
T6	0,439	0,988	0,528	0,991

El ajuste de Baker-Lonsdale [98] también presentó coeficientes de correlación altos (Tabla III.15), lo cual corrobora que la liberación sigue un proceso de difusión.

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (\text{III.4})$$

donde M_t es la cantidad de fármaco liberada a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco liberado a tiempo infinito y k la constante de liberación y pendiente de la recta.

Tabla III.15. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de hidrocloreuro de tramadol de microesferas de HCS en SGF y SIF al modelo de Baker-Lonsdale.

Lote	SGF		SIF	
	K	R ²	K	R ²
T2	0,139	0,982	0,162	0,995
T3	0,022	0,9649	0,311	0,906
T4	0,116	0,989	0,132	0,936
T5	0,165	0,934	0,143	0,968
T6	0,115	0,987	0,122	0,968

2.8 Conclusiones parciales del capítulo

De los estudios realizados para la encapsulación de hidrocloreuro de tramadol en microesferas obtenidas por atomización se puede concluir:

- El método de atomización resultó adecuado para la encapsulación de hidrocloreuro de tramadol, con alta eficiencia de encapsulación.
- La velocidad de liberación del hidrocloreuro de tramadol es rápida debido a la alta hidrofilia de este fármaco. El entrecruzamiento con genipina redujo el efecto estallido al inicio de la liberación y retardó la liberación del fármaco en el tiempo.
- El aumento de la concentración de genipina dio lugar a una liberación más baja del principio activo. Con una concentración 20mM de genipina se alcanzó un grado de entrecruzamiento óptimo en ambos medios de liberación.
- Los valores de potencial zeta fueron todos positivos, lo cual favorece la mucoadhesión de las microesferas.
- Los perfiles de liberación se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi con un mecanismo de difusión a través de la matriz polimérica. El tipo de difusión varió en función del pH del medio y del grado de entrecruzamiento

3 Películas de quitosano con hidrocloreto de ciprofloxacino

En el campo de la farmacia, las películas de quitosano podrían ser utilizadas para el recubrimiento de comprimidos y como sistemas de liberación controlada de fármacos. En los últimos años, el uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas e infecciones cutáneas ha suscitado un gran interés puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y sostenida en el sitio de acción[44]. Además, el carácter antimicrobiano y cicatrizante del quitosano aporta propiedades favorables a los sistemas de liberación de uso tópico [45, 47, 125].

El objetivo de este capítulo del trabajo ha sido la obtención, por el método de evaporación de solvente, de películas de quitosano para la encapsulación de hidrocloreto de ciprofloxacino.

Una vez obtenidas las películas, se realizaron estudios de caracterización: morfología, hinchamiento e interacción fármaco-polímero. Así mismo se llevaron a cabo estudios de liberación *in vitro*, estudiando el efecto de tres variables sobre la liberación del fármaco: la concentración de agente entrecruzante, el tiempo de entrecruzamiento, y el espesor de las películas.

3.1 Obtención de las películas

La eficiencia de encapsulación de todas las películas obtenidas fue mayor del 80%, una eficiencia de encapsulación alta teniendo en cuenta que las películas cargadas con fármaco fueron sumergidas en soluciones de TPP para ser entrecruzadas.

En la Tabla III.16 se muestran las características de las películas obtenidas a diferentes concentraciones de TPP, tiempos de entrecruzamiento y espesores.

Tabla III.16. Condiciones de preparación de las películas de quitosano (CS) cargadas con hidrocloreto de ciprofloxacino (CIP).

Película	CS (% p/v)	CIP (% p/p)	TPP (% p/v)	V (mL)	Tiempo* (h)
CP1	3	30	--	5	--
CP2	3	30	1	5	0,5
CP3	3	30	1	5	1
CP4	3	30	1	5	4
CP5	3	30	2,5	5	0,5
CP6	3	30	2,5	5	1
CP7	3	30	2,5	5	4
CP8	3	30	5	5	0,5
CP9	3	30	5	5	1
CP10	3	30	5	5	4
CP11	3	30	2,5	10	1
CP12	3	30	2,5	10	4

3.2 Estudios de morfología

En la Figura III.31 se muestran las microfotografías de los cortes transversales de diferentes películas de quitosano. Las películas de quitosano y las películas de quitosano entrecruzadas con TPP, ambas sin fármaco, presentaron una superficie lisa y un corte homogéneo. Como ejemplo de esto, en la Figura III.31A se muestra una película de quitosano. Las películas cargadas con hidrocloreto de ciprofloxacino y entrecruzadas con TPP, sin embargo, presentaron una morfología irregular, con cambios en la superficie y en el corte, como se puede observar en la Figura III.31B. Por lo tanto, la presencia de principio activo cambió notablemente la estructura del interior de las películas. Shu *et al.* (2001) también observaron cambios en la morfología superficial y en el corte de películas de quitosano entrecruzadas con citrato después de añadir el fármaco[126].

En general, el espesor de las películas varió dentro del rango de 100-300 μm en función del volumen de quitosano utilizado para obtener la película. Las películas que se presentan en la Figura III.31 se obtuvieron a partir de soluciones de quitosano de 5mL.

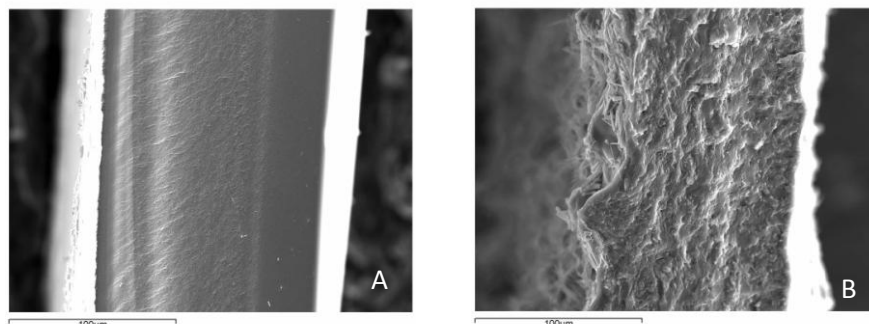


Figura III.31. Microfotografías de SEM de los cortes transversales de las películas: A) película de quitosano (3% p/v); B) película de quitosano (3% p/v) cargada con hidrocloreto de ciprofloxacino y entrecruzada con 5% TPP (p/v) durante 30 minutos.

3.3 Grado de hinchamiento de las películas

El estudio del grado de hinchamiento de las películas en el medio en el que se realizan los estudios de liberación *in vitro* es necesario, puesto que su comportamiento en dicho medio va a afectar a la liberación del fármaco. El hinchamiento de las películas de quitosano y TPP dependerá del pH del medio de liberación, ya que las interacciones electrostáticas existentes entre ambos polianiones están controladas por el pH del medio[127].

Se estudió el efecto la concentración de TPP y del tiempo de entrecruzamiento sobre el hinchamiento de las películas sin fármaco en PBS a pH 7,4. El hinchamiento se determinó por la ecuación:

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \quad (\text{III.5})$$

donde M es el peso de la película a un tiempo t y M_0 es el peso de la película antes del proceso de hinchamiento.

Efecto de la concentración de TPP sobre el grado de hinchamiento

La Figura III.32 muestra las diferencias del grado de hinchamiento de las películas al ser entrecruzadas con soluciones de TPP de diferentes concentraciones (0-5% p/v). Las películas no entrecruzadas con TPP presentaron un grado de hinchamiento de 2, mientras que las entrecruzadas con soluciones de TPP al 1 y 5% (p/v) durante 1 hora, presentaron un grado de hinchamiento significativamente más bajo ($p < 0,05$); 0,8 y 0,6 respectivamente. Esto indica que la interacción iónica entre el quitosano y el TPP dio lugar a una matriz entrecruzada que impidió la entrada de agua y, por este motivo, las películas entrecruzadas se hincharon muy poco. Por otra parte, el hinchamiento no fue significativamente distinto ($p > 0,05$) para las dos concentraciones de TPP estudiadas (1 y 5% p/v). Esto puede deberse a que el entrecruzamiento con 1% (p/v) TPP diese lugar a una matriz lo suficientemente entrecruzada como para no permitir la entrada de agua.

Shu *et al.* (2002) [127] comprobaron que las películas de quitosano y TPP se hinchan débilmente a pH 7,4-9,5, lo que coincide con nuestros resultados. Estos mismos autores en 2001 [126], observaron el mismo comportamiento en películas de quitosano entrecruzadas con citrato. Por lo tanto, el entrecruzamiento de las películas con polianiones da lugar a un bajo grado de hinchamiento, y este hecho favorecerá el control de la liberación del fármaco.

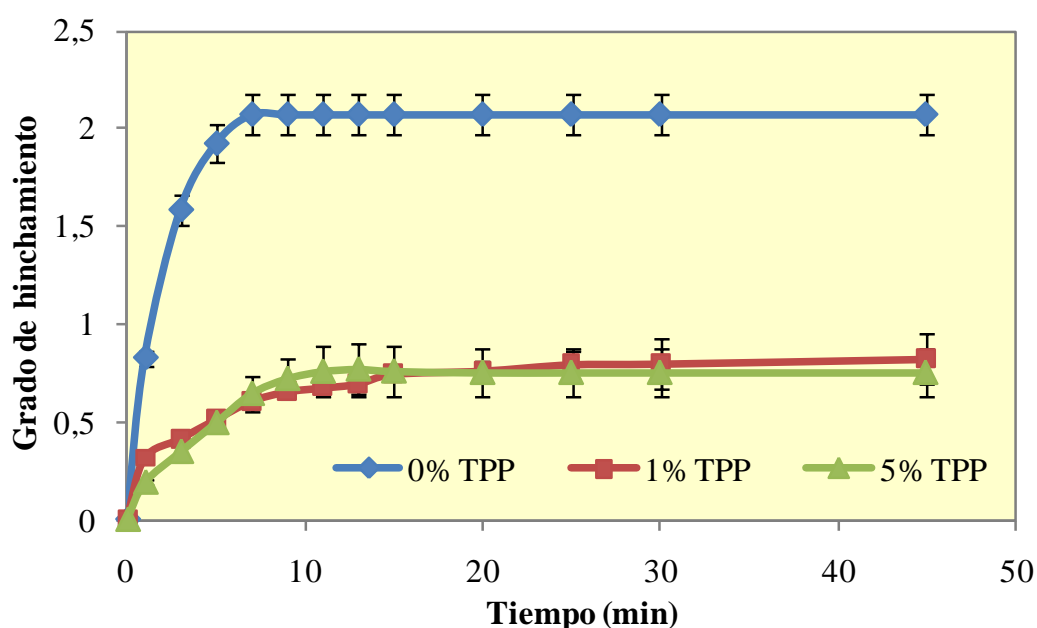


Figura III.32. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (3% p/v) entrecruzadas con 0, 1 y 5% (p/v) de TPP, en PBS (pH 7,4) a 37°C y 100rpm de agitación.

Efecto del tiempo de entrecruzamiento sobre el grado de hinchamiento

La Figura III.33 muestra el hinchamiento de las películas entrecruzadas con 1% (p/v) de TPP a pH 9 y sometidas a distintos tiempos de entrecruzamiento (1 y 4 horas). El grado de hinchamiento a 45 minutos, para las películas sumergidas en la solución de TPP durante 1 y 4 horas fue de 0,8 y 0,7, respectivamente. Como se puede observar, un aumento del tiempo de entrecruzamiento provocó una ligera disminución del grado de hinchamiento, aunque no existen diferencias significativas entre los perfiles de hinchamiento.

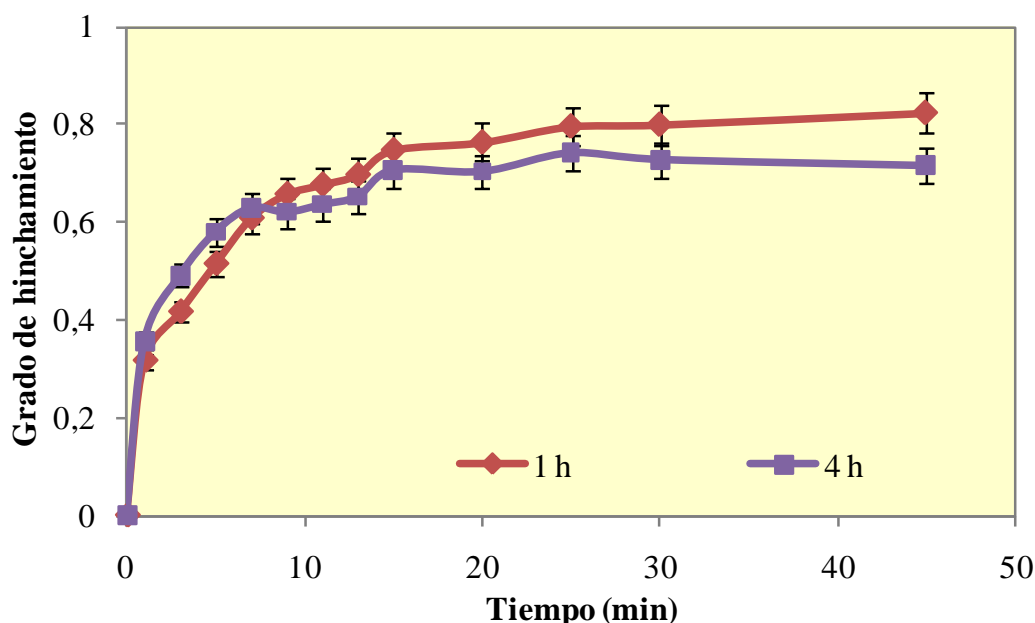


Figura III.33. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (3% p/v) entrecruzadas con 1% (p/v) de TPP durante 1 y 4 horas, en PBS (pH 7,4), a 37°C y 100rpm de agitación.

Los perfiles de hinchamiento se ajustaron a la ecuación de Schott:

$$\frac{t}{W} = A + Bt \quad (\text{III.6})$$

donde W representa el hinchamiento a tiempo t y B es el inverso del hinchamiento máximo.

Como se observa en la Figura III.34, los ajustes presentaron coeficientes de correlación altos ($R^2 \geq 0,98$). Por consiguiente, el proceso de hinchamiento de estas películas está gobernado por la relajación de las cadenas del polímero. Como se ha visto en la

Introducción, los materiales que se ajustan a la ecuación de Schott siguen una cinética de segundo orden [53], hecho que cumplen los resultados de este apartado.

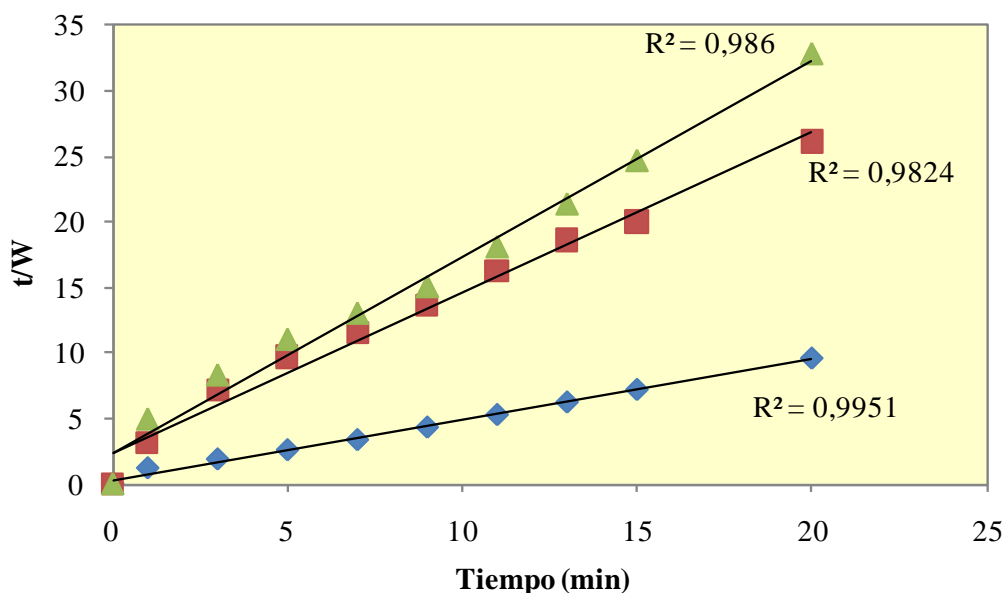


Figura III.34. Perfiles de hinchamiento de las películas de quitosano (3% p/v) (◆) y de las películas de quitosano (3% p/v) entrecruzadas durante 1 hora con 1% (p/v) de TPP (■) y 5% (p/v) de TPP (▲) en PBS (pH 7,4), ajustados a la ecuación de Schott.

3.4 Estudios de interacción fármaco-polímero

3.4.1 Difracción de rayos X

El índice de cristalinidad del quitosano en polvo, la película de quitosano, la mezcla física de quitosano, fármaco y TPP; la película con fármaco y la película con fármaco y TPP se determinó por el método de Segal para la celulosa [102].

$$\text{ICr (\%)} = (I_{110} - I_{\text{am}} / I_{110}) \cdot 100 \quad (\text{III.7})$$

donde I_{110} es la intensidad máxima de la reflexión a $2\theta = 20^\circ$ y I_{am} es la intensidad mínima de la difracción en la región amorfa a $2\theta = 16^\circ$ aproximadamente [103-105].

En la Tabla III.17 se muestran los valores del índice de cristalinidad obtenidos.

Tabla III.17. Índice de cristalinidad (%) de: quitosano (CS), película de quitosano, mezcla física de quitosano, TPP y ciprofloxacino (MF), película de quitosano con ciprofloxacino (película CIP) y película de quitosano con ciprofloxacino y TPP (película CIP TPP).

Muestra	IC
CS	73,26 %
Película de CS	59,32 %
MF	75 %
Película CIP	67 %
Película CIP TPP	50 %

Los resultados obtenidos para el índice de cristalinidad muestran que el quitosano en polvo presentó mayor cristalinidad que en la película formada. En la Figura III.35 se representan los difractogramas comparados del quitosano en polvo (a) y en forma de película (b). En el caso del quitosano en polvo se observan dos reflexiones a $2\theta=10,62^\circ$ y $20,18^\circ$, las cuales son propias de quitosanos de la forma II. La cristalinidad depende en gran medida del grado de desacetilación del quitosano, que en este caso es del 90% [106,128].

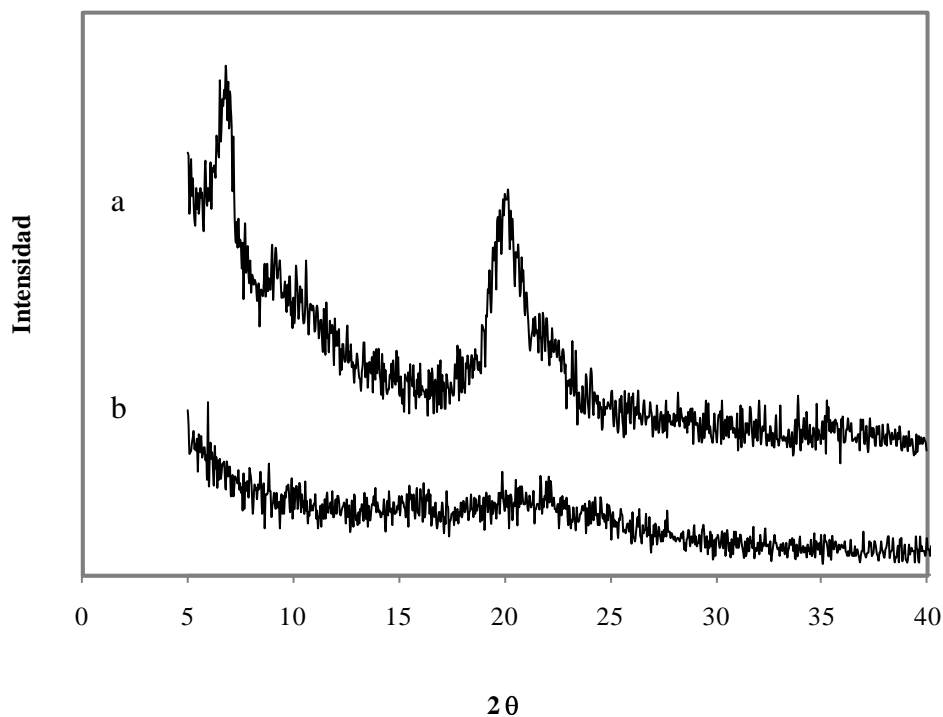


Figura III.35. Difractogramas de rayos X de quitosano en polvo (a) y de la película de quitosano (b).

Los difractogramas de rayos X del hidrocloreto de ciprofloxacino (c) y de la película de quitosano con el principio activo (d) se muestran en la Figura III.36. El hidrocloreto de ciprofloxacino presenta reflexiones a valores de $2\theta = 8,24^\circ$; $9,08^\circ$; $19,36^\circ$; $26,56^\circ$ y $29,28^\circ$. Sin embargo, en el difractograma de la película con hidrocloreto de ciprofloxacino, no aparecen las reflexiones características del fármaco, aunque sí una nueva reflexión a $2\theta = 6,38$. El índice de cristalinidad determinado para dicha película fue del 67%, valor más alto que el de la película de quitosano.

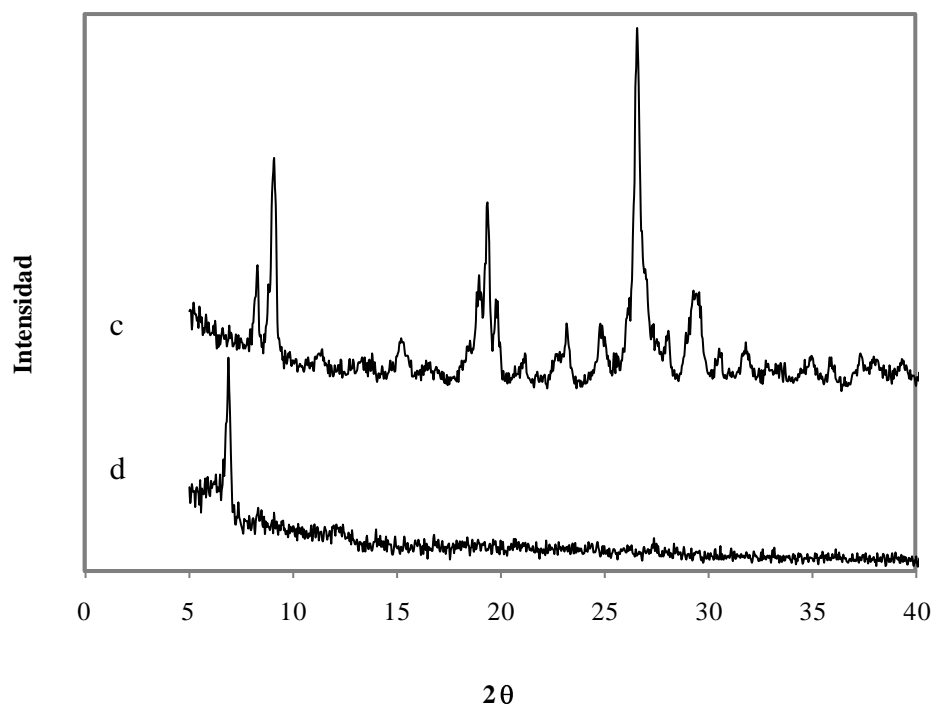


Figura III.36. Difractogramas de rayos X del hidrocloreuro de ciprofloxacino (c) y de la película de quitosano con hidrocloreuro de ciprofloxacino (d).

Por otra parte, en la Figura III.37 se pueden observar los difractogramas de la mezcla física (e) de quitosano, TPP e hidrocloreuro de ciprofloxacino y de la película (f) con estos componentes. El índice de cristalinidad también se calculó, siendo del 75% para la mezcla física de los componentes y del 50% para la película. Por lo tanto, la cristalinidad de la mezcla física resultó mayor que la de la película, lo cual verifica que los tres componentes de la película no interaccionaron en la mezcla física. Sin embargo, en las películas de quitosano se produjo una incorporación del hidrocloreuro de ciprofloxacino y una reacción de tipo iónico entre el quitosano y el TPP. La cristalinidad disminuyó notablemente tras la formación de las películas, lo cual indica que el ciprofloxacino y el TPP están molecularmente dispersos en la matriz polimérica [25].

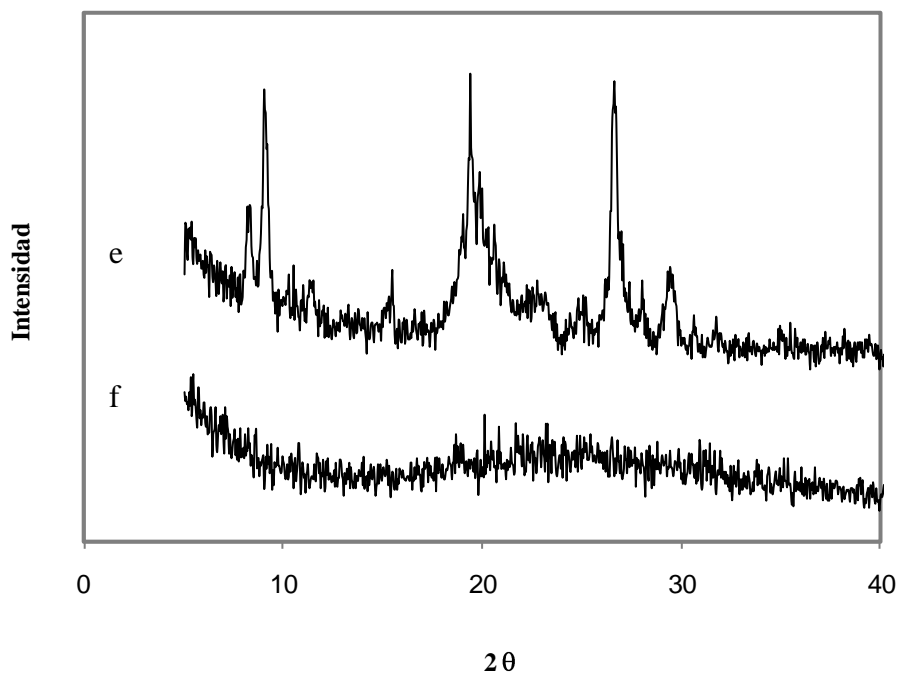


Figura III.37. Difractogramas de rayos X de la mezcla física de quitosano, fármaco y TPP (e) y de una película de quitosano con fármaco y TPP (f).

3.4.2 Espectroscopía de infrarrojo

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo (FT-IR) del quitosano utilizado y de las películas de quitosano, de quitosano con fármaco y entrecruzadas con TPP. En la Figura III.38 se muestran los espectros de una película de quitosano (a) sin fármaco y sin agente entrecruzante y del quitosano (b).

El quitosano en polvo presentó bandas de absorción a 1594cm^{-1} y 1650cm^{-1} , que se atribuyen a la amida II (N-H) y la amida I (C=O) respectivamente; bandas a 1380cm^{-1} , debido a la vibración del grupo C-CH₃ y a 3441cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración del grupo -OH e indica la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en las moléculas de quitosano.

En el caso de la película de quitosano, las bandas de absorción a 1594cm^{-1} y 1650cm^{-1} , que aparecieron en el quitosano en polvo, disminuyeron a 1634 y 1558cm^{-1} , debido a la relajación de las cadenas.

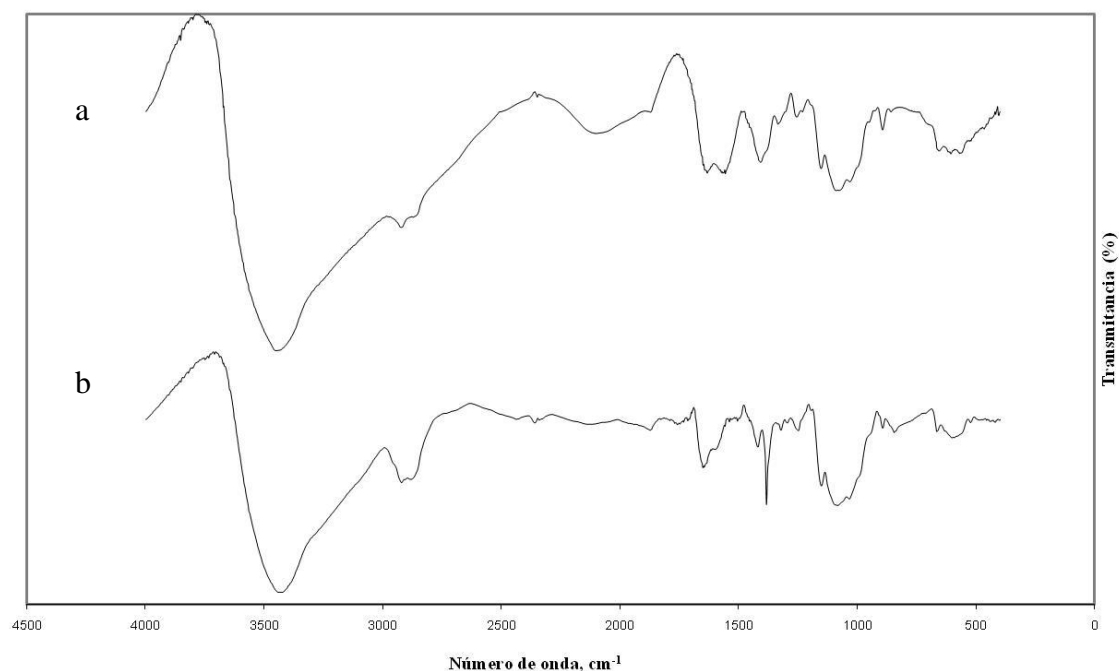


Figura III.38. Espectros FT-IR de una película de quitosano (a) y de quitosano en polvo (b).

El espectro de una película de quitosano cargada con hidrocloreto de ciprofloxacino (c) y el del principio activo (d) se muestran en la Figura III.39.

El hidrocloreto de ciprofloxacino presentó bandas de absorción características a 1273 y 1625cm^{-1} , indicando la vibración del enlace C-F y la vibración del grupo fenilo conjugado al grupo $-\text{COOH}$, respectivamente; a 1709cm^{-1} debido a la vibración del grupo $-\text{COOH}$, y a 2918 y 3084cm^{-1} debido a las vibraciones de C-H del grupo fenilo [129].

En el espectro de la película cargada con el principio activo se observa que la banda de absorción a 3441cm^{-1} varió a un número de onda más bajo (3427cm^{-1}) y que la misma resultó ser más ancha, lo cual indica que se formaron enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas entre el hidrocloreto de ciprofloxacino y la matriz de la película de quitosano. Así mismo, se observó que aparecieron nuevas bandas de absorción a 1723 y 1271cm^{-1} , debido a la incorporación del principio activo a la matriz.

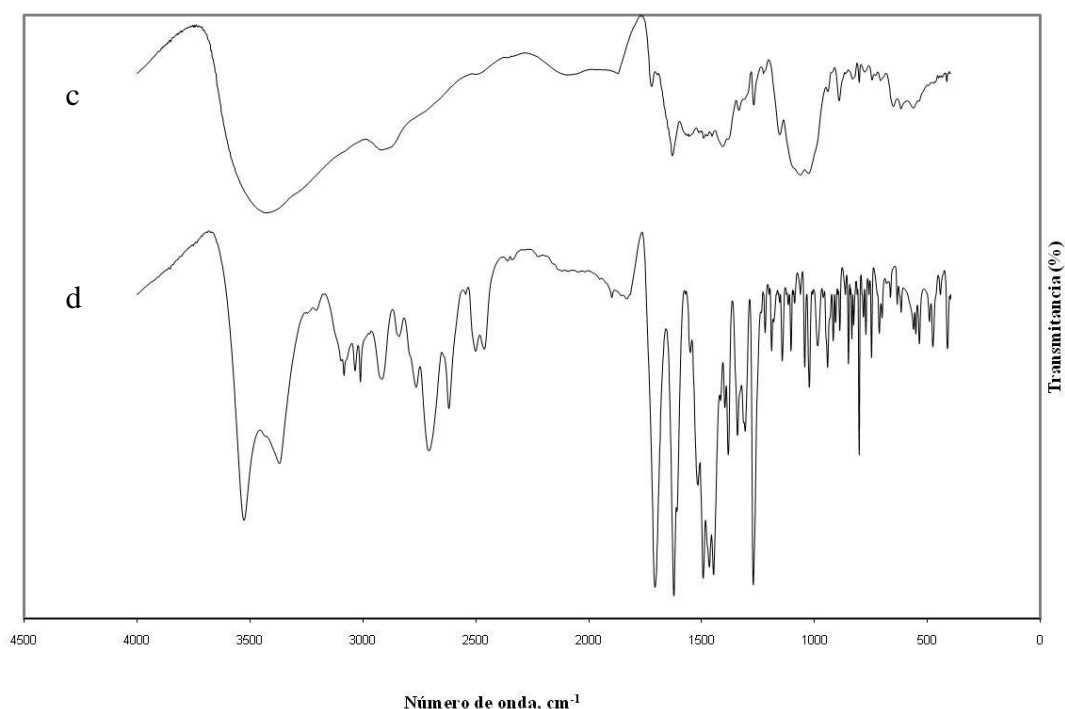


Figura III.39. Espectros FT-IR de una película cargada con hidrocloreto de ciprofloxacino (c) y del hidrocloreto de ciprofloxacino (d).

Por último, como puede observarse en la Figura III.40, se analizaron los espectros de una película de quitosano y TPP (e), de una película con ciprofloxacino y TPP (f) y del TPP (g).

El TPP presentó bandas de absorción características a 1092 , 1148 y 1213cm^{-1} debido al grupo $\text{P}=\text{O}$ y a 3389cm^{-1} debido a la vibración del $-\text{OH}$ [130]. El espectro de la película de quitosano con fármaco y TPP muestra la desaparición de la banda de absorción a 1709cm^{-1} , que corresponde a la vibración del grupo $-\text{COOH}$ del hidrocloreto de ciprofloxacino, lo cual significa que se produjo una reacción del fármaco con la sal.

Por otra parte, la interacción iónica entre el quitosano y el TPP dio lugar a una banda de absorción a 1150cm^{-1} , indicando la presencia de un grupo $\text{P}=\text{O}$. Mi y col. describieron en 2003 que al interaccionar quitosano y TPP la intensidad de la banda de $\text{P}=\text{O}$ aumentaba [80].

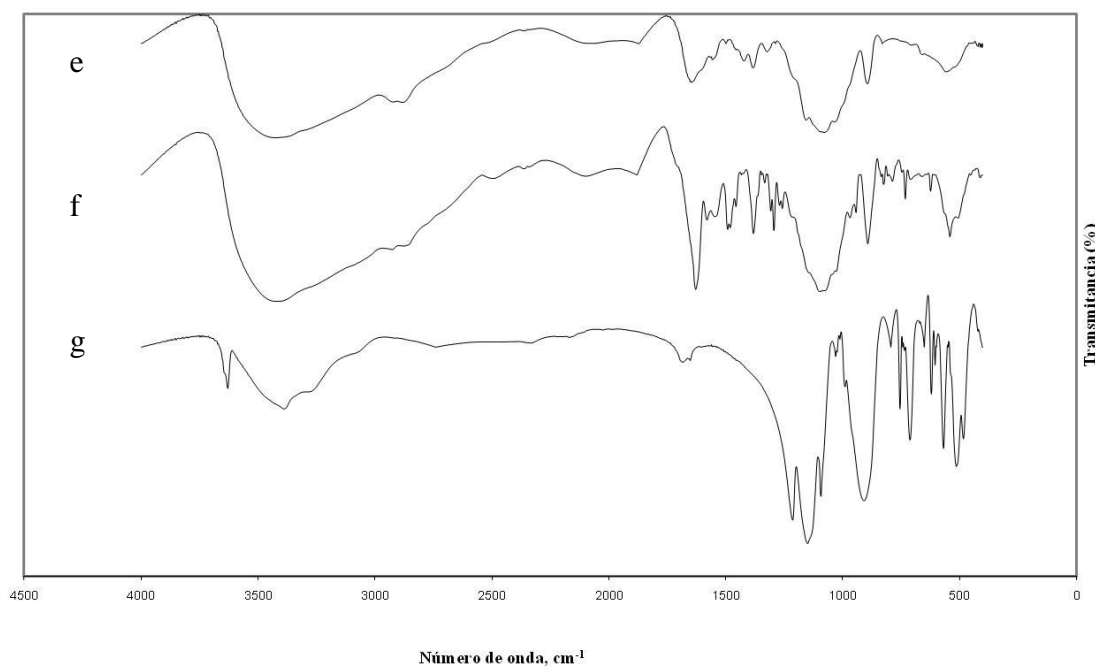


Figura III.40. Espectros de FT-IR de una película de quitosano sin fármaco entrecruzada con TPP 5% (p/v) (e), de una película con hidrocloreuro de ciprofloxacino y entrecruzada con TPP 5% (p/v) (f) y del TPP (g).

3.5 Ensayos de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo en PBS (pH 7,4). Se estudió el efecto de tres variables sobre la liberación de hidrocloreuro de ciprofloxacino:

- La concentración de TPP
- El tiempo de entrecruzamiento
- El espesor de las películas

Efecto de la concentración de TPP

La Figura III.41 muestra los perfiles de liberación del fármaco de las películas de quitosano entrecruzadas durante una hora con diferentes concentraciones de TPP (0, 1, 2,5 y 5% p/v). Las diferentes concentraciones de TPP provocaron una reducción significativa ($p < 0,05$) en la liberación con respecto a las películas sin TPP. Además, un aumento de la concentración del agente entrecruzante dio lugar a una liberación más lenta del principio activo, aunque las diferencias fueron poco significativas ($p > 0,05$). Después de 24 horas de ensayo, se liberó el 85, 60, 50 y 44% del fármaco de las películas sumergidas en soluciones con 0, 1, 2,5 y 5% (p/v) de TPP respectivamente.

Por lo tanto, películas de quitosano entrecruzadas con TPP presentaron una liberación controlada del principio activo utilizado.

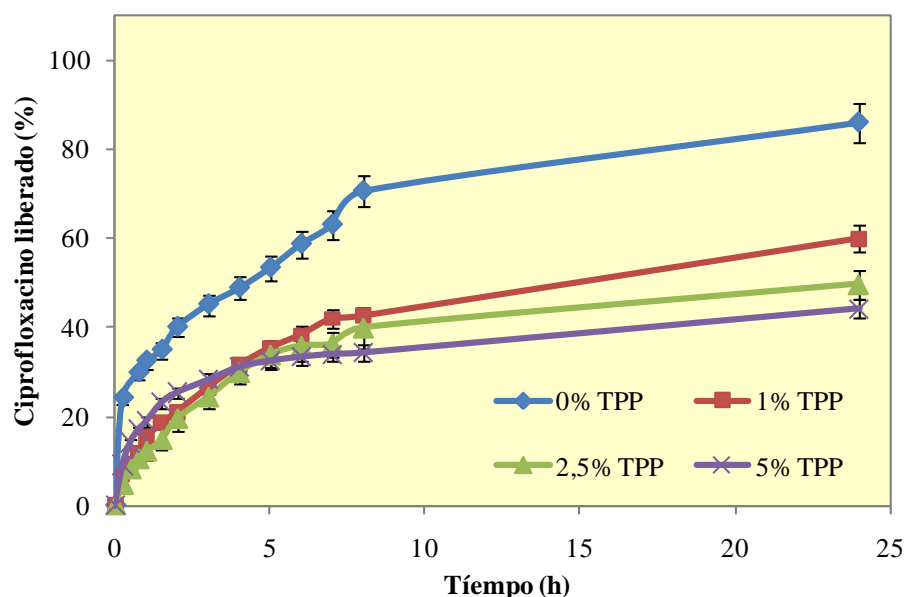


Figura III.41. Perfiles de liberación del hidrocloreto de ciprofloxacino de películas de quitosano (3% p/v) entrecruzadas durante 1 hora con diferentes concentraciones de TPP (0, 1, 2,5 y 5% p/v), en PBS (pH 7,4) a 37°C y 100rpm de agitación.

Efecto del tiempo de entrecruzamiento

Se observaron diferencias en la liberación en función del tiempo de entrecruzamiento en la solución de TPP. En la Figura III.42 se muestran los perfiles de liberación de películas sumergidas en TPP al 1% (p/v) durante distintos períodos de tiempo (0, 0,5, 1 y 4 horas). La cantidad de fármaco liberado en 24 horas fue significativamente menor ($p < 0,05$) para las películas entrecruzadas durante los diferentes tiempos de entrecruzamiento con respecto a las no entrecruzadas. Además, las películas entrecruzadas durante 4 horas presentaron diferencias significativas con respecto a las entrecruzadas durante menos tiempo ($p < 0,05$). A las 24 horas se liberó el 86, 60, 60 y 48% del total del ciprofloxacino cargado de las películas sumergidas en TPP al 1% (p/v) durante 0, 0,5, 1 y 4 horas respectivamente. El efecto del tiempo de entrecruzamiento sólo se observó cuando se mantuvieron durante 4 horas en la solución de TPP; a tiempos mayores de incubación no se observaron diferencias en la cantidad total de fármaco liberado.

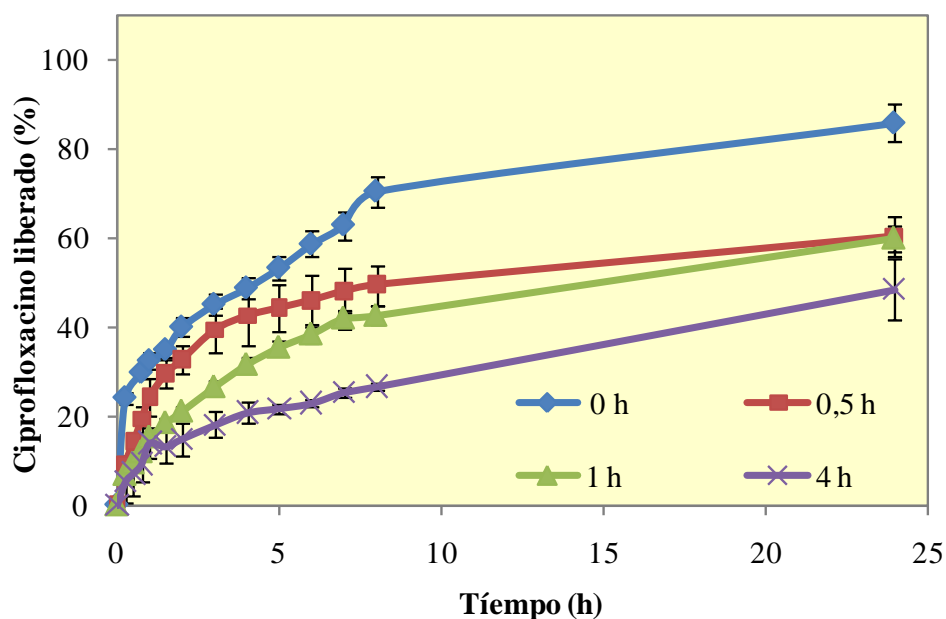


Figura III.42. Perfiles de liberación del hidrocloreto de ciprofloxacino de películas de quitosano (3% pv) sumergidas en TPP al 1% (p/v) durante 0, 0,5, 1 y 4 horas, en PBS (pH 7,4) a 37°C y 100rpm de agitación.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios de hinchamiento, ya que las películas que no fueron sometidas a entrecruzamiento presentaron un rápido hinchamiento y una liberación más rápida del fármaco que las películas entrecruzadas. Esto es debido a que un mayor grado de entrecruzamiento dio lugar a una matriz más reticulada y compacta, controlando por tanto el hinchamiento de las películas y la cantidad de fármaco liberado.

Otros estudios descritos en la bibliografía sobre películas de quitosano entrecruzadas con TPP muestran resultados que concuerdan con los mostrados en este trabajo. Wang *et al.* (2007) [131] estudiaron la liberación *in vitro* de hidrocloreto de ciprofloxacino de películas preparadas a partir de una mezcla de quitosano y polietilenglicol. Estos autores también observaron un descenso significativo de la liberación en PBS (pH 7,4) de películas entrecruzadas con TPP, llegando a liberar sólo un 40% del fármaco encapsulado en 24 horas. También observaron un efecto del tiempo de entrecruzamiento sobre la liberación. Los resultados son difíciles de comparar con los obtenidos en el presente trabajo puesto que la cantidad de fármaco cargado en las películas fue diferente, lo cual influye sobre la liberación, como también demostraron estos autores. A pesar de ello, ambos resultados muestran un control de la liberación del principio activo mediante el entrecruzamiento con TPP.

Shu & Zhu (2002) [127] realizaron ensayos de liberación *in vitro* de riboflavina encapsulada en películas de quitosano entrecruzadas con TPP para comprobar la sensibilidad de la interacción quitosano-TPP en función del pH del medio de liberación. Tanto el incremento del tiempo de entrecruzamiento como de la concentración de TPP disminuyeron la liberación de riboflavina en SGF y SIF, siendo significativamente menor en SIF (pH 7,4). Después de 24 horas se liberó un 20% de riboflavina en SIF de películas entrecruzadas con 5% TPP (p/v) durante 1 hora.

Remuñán & Bodmeier (1997) [43] observaron un efecto de la concentración de TPP sobre la difusión de fármaco a través de películas de glutamato de quitosano. La liberación de fármaco fue más lenta con concentraciones más altas de TPP, lo que concuerda con los resultados que obtuvieron en los estudios de hinchamiento, el cual fue menor en películas entrecruzadas con mayor concentración de TPP.

Efecto del espesor de las películas de quitosano

Se estudió el efecto del espesor de las películas sobre la liberación de hidrocloreto de ciprofloxacino. Se prepararon soluciones de distintos volúmenes, 5 y 10mL, para obtener películas de quitosano de distinto espesor, aproximadamente 100 y 300 μ m, respectivamente. En la Figura III.43 se muestran los perfiles de liberación de películas de diferentes grosores. En los ensayos de liberación se observó cómo, efectivamente, las películas de menor espesor liberaron el fármaco de forma significativamente más rápida ($p < 0,05$) que las películas más de mayor espesor. Las primeras liberaron, después de 24 horas, un 50% del total de fármaco cargado, mientras que las segundas liberaron un 25% en 24 horas, debido a la mayor distancia que debe recorrer el fármaco para atravesar la matriz de quitosano y TPP.

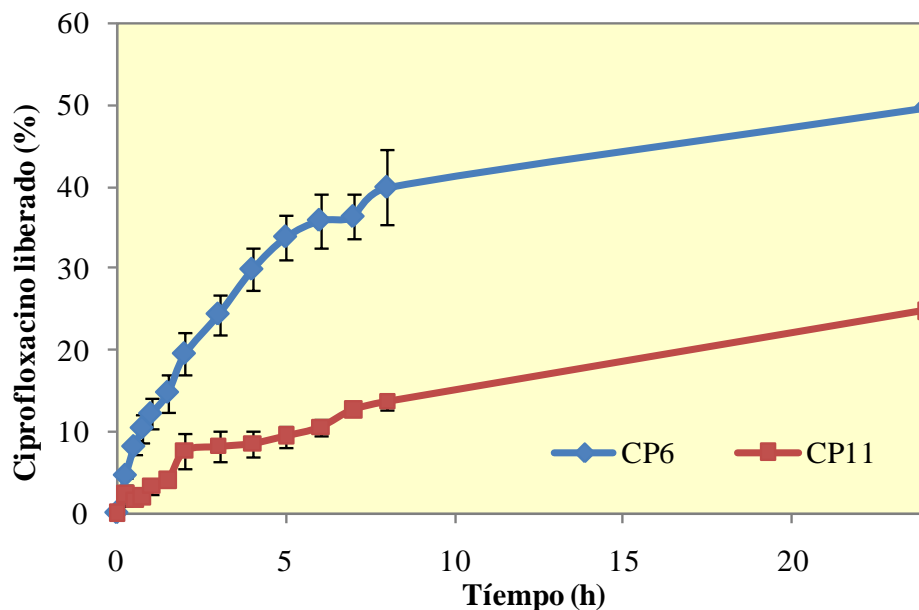


Figura III.43. Perfiles de liberación del hidrocloreto de ciprofloxacino de películas de quitosano (3% p/v) con diferente espesor, 100µm (CP6) y 300µm (CP11), entrecruzadas con TPP al 2,5% (p/v) durante 1 hora, en PBS (pH 7,4) a 37°C y 100rpm de agitación.

Ajustes de los perfiles de liberación a modelos matemáticos

Los perfiles de liberación del hidrocloreto de ciprofloxacino se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (\text{III.2})$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado y K_H es la constante de disolución de Higuchi, que describe la liberación por un proceso de difusión basado en la ley de Fick.

Como se puede observar en la Tabla III.18, los coeficientes de correlación obtenidos para todas las películas resultaron altos ($\geq 0,92$). Esto significa que la liberación del principio activo desde la matriz siguió un mecanismo de difusión.

Con el fin de determinar el mecanismo de difusión, los datos se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas [132].

$$M_t/M_\infty = K t^n \quad (\text{III.3})$$

donde M_t es cantidad de fármaco liberado a tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito, K es la constante del sistema y n es el exponente difusional.

Los valores obtenidos para el exponente difusional (n) se muestran en la Tabla III.18. Las películas presentaron un exponente difusional próximo a 0,5 en todos los casos, excepto la película que no fue sometida a entrecruzamiento, que presentó un valor más bajo. Para valores de $n = 0,5$ se observa una difusión Fickiana y para $n > 0,5$ se trata de una difusión anómala. A la vista de los resultados, en general la liberación de las películas entrecruzadas con TPP siguió un proceso de difusión Fickiana.

Tabla III.18. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de hidrocloreuro de ciprofloxacino de las películas de quitosano a los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

Películas	Higuchi		Peppas	
	K_H	R^2	n	R^2
CP1	21,294	0,967	0,303	0,977
CP2	17,873	0,958	0,503	0,966
CP3	15,922	0,997	0,509	0,985
CP4	9,189	0,977	0,460	0,978
CP5	15,139	0,980	0,449	0,959
CP6	14,001	0,990	0,554	0,964
CP7	12,492	0,986	0,602	0,941
CP8	18,361	0,968	0,504	0,942
CP9	11,728	0,929	0,410	0,947
CP10	11,422	0,927	0,420	0,911

3.6 Conclusiones parciales del capítulo

De los resultados obtenidos se pueden extraer una serie de conclusiones que se exponen a continuación y que muestran el potencial empleo de las películas de quitosano para la administración de fármacos por vía tópica.

- Se obtuvieron películas de quitosano con hidrocloreuro de ciprofloxacino por el método de evaporación de solvente.

- Los estudios de difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido mostraron que el principio activo se encuentra completamente incluido en la matriz polimérica.
- El entrecruzamiento con tripolifosfato sódico conlleva una disminución del grado de hinchamiento de las películas, lo cual indica que la matriz polimérica es más densa.
- El aumento del grado de entrecruzamiento disminuyó la velocidad de liberación del fármaco. Se alcanzó un grado de entrecruzamiento óptimo con una concentración de 1% (p/v) de tripolifosfato sódico y a tiempos cortos de entrecruzamiento.
- Los perfiles de liberación se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi. El principio activo fue liberado siguiendo un mecanismo de difusión a través de la película de quitosano.

4 Estudio del efecto del quitosano sobre las uniones estrechas de células Calu-3

Actualmente, la mayor parte de los fármacos proteicos y peptídicos son administrados por vía parenteral. Esto es debido a su gran tamaño, su hidrofilia y su inestabilidad en el medio gastrointestinal, dando lugar a una baja biodisponibilidad cuando son administrados por vía oral. Sin embargo, el coste y el riesgo potencial de la ruta parenteral precisan la investigación de rutas alternativas. Como se describió en el Capítulo de la Introducción, la vía de administración nasal está recibiendo gran atención como alternativa debido a la alta vascularización de la mucosa nasal y a su alta superficie de absorción [33, 133].

En cualquier caso, la liberación adecuada y la absorción sistémica de los fármacos macromoleculares en la cavidad nasal requiere superar varias barreras biológicas que presenta la mucosa nasal, dentro de las cuales destacan: el mecanismo de limpieza mucociliar, la presencia de proteasas y la existencia de uniones estrechas entre las células epiteliales, que limitan la permeabilidad de moléculas a partir de 1000 Da [133]. Se han propuesto diversos promotores de la absorción de los fármacos para superar estas limitaciones, siendo una de las propuestas más estudiadas el uso de soluciones de polímeros bioadhesivos o sistemas de liberación producidos a partir de ellos. En este sentido, es conocido que el quitosano tiene la capacidad de promover la absorción de moléculas debido a su acción sobre las uniones estrechas entre las células epiteliales [134-136].

Por todo ello, el objetivo de este capítulo ha sido estudiar el efecto de la solución de hidrocloreto de quitosano y de las nanopartículas de hidrocloreto de quitosano sobre la apertura de las uniones estrechas intercelulares y sobre la permeabilidad de macromoléculas a través de las monocapas de células Calu-3.

La línea celular utilizada deriva de carcinoma de pulmón (bronquial) y se trata de una línea relativamente establecida, que se utiliza como modelo de epitelio bronquial o nasal.

4.1 Obtención y caracterización de nanopartículas de hidrocloreuro de quitosano

Se obtuvieron nanopartículas por gelificación ionotrópica del hidrocloreuro de quitosano y el TPP [33] y se caracterizaron, determinando su tamaño y su potencial zeta.

Las Tablas III.19 y III.20 muestran la influencia de dos variables sobre el tamaño de las nanopartículas obtenidas: el pH de la solución de TPP y la concentración de hidrocloreuro de quitosano, respectivamente.

Al disminuir el pH del TPP de 9 a 4 se obtuvieron nanopartículas de menor tamaño, por lo que se utilizó la solución de TPP a pH 4 en los siguientes experimentos.

La concentración de hidrocloreuro de quitosano también influyó en el tamaño de las nanopartículas, obteniéndose tamaños menores con una concentración de HCS de 0,15% (p/v). Con las concentraciones de HCS más altas (0,08 y 0,05% p/v) se formaron agregados al añadir la solución de TPP a pH 4 a la solución de HCS.

Tabla III.19. Efecto del pH del TPP sobre el tamaño de las nanopartículas con HCS 0,2% p/v y TPP 0,084% (p/v).

pH TPP	9,0	5,5	4,0
Radio (nm)	524,0	336,5	254,7

Tabla III.20. Efecto de la concentración de HCS (0,05-0,20% p/v) sobre el tamaño de las nanopartículas con TPP 0,084% (p/v) a pH 4,0.

HCS	0,20	0,18	0,15	0,1	0,08	0,05
(% p/v)						
Radio (nm)	254,7	238,9	120,4	145,4	---	---

Las nanopartículas que se obtuvieron con una solución de hidrocloreuro de quitosano de 0,15% (p/v) y una solución de TPP 0,08% (p/v) a pH 4 presentaron menor tamaño y, por tanto, se utilizaron en los experimentos posteriores. Las nanopartículas seleccionadas resuspendidas en KCl presentaron un valor de potencial zeta de $37,1 \pm 0,3$.

Las concentraciones de hidrocloreuro de quitosano y TPP establecidas como óptimas para la obtención de nanopartículas son comparables con las utilizadas previamente por Calvo *et al.* (1997), en el orden de 0,1-0,3 % (p/v) para el quitosano y de 0,02-0,01% (p/v) para

el TPP. Por otra parte, la proporción HCS/TPP (p/p) óptima resultó ser 4, lo cual es comparable con los resultados obtenidos en el estudio de Calvo *et al.* (1997), que emplearon proporciones entre 3 y 5 [31]. Así mismo, Papadimitriou *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la proporción CS/TPP sobre el tamaño de las nanopartículas y obtuvieron partículas de menor tamaño al aumentar la proporción CS/TPP, siendo la proporción p/p óptima de 5 [137].

Las nanopartículas fueron caracterizadas en términos de tamaño y potencial zeta después de ser resuspendidas en medio HBSS a pH 6, medio utilizado en los ensayos celulares. Presentaron un radio medio de $339,9 \pm 66,3$ nm (Figura III.44) y un valor de potencial zeta de $11,3 \pm 2,7$ mV. Se determinó el potencial zeta de la disolución de hidrocloreto de quitosano de referencia en el medio (pH 6) y presentó un valor de $30,8 \pm 2,4$ mV, el cual es aproximadamente tres veces mayor que el de las nanopartículas. El valor del potencial zeta obtenido resultó positivo, tanto para la solución como para las partículas de hidrocloreto de quitosano, lo cual es importante pues se mantienen las propiedades mucoadhesivas de ambos [124].

Esta marcada diferencia en el valor del potencial zeta puede explicarse si tenemos en cuenta que en las nanopartículas, el hidrocloreto de quitosano está cargado positivamente e interacciona con el TPP, cargado negativamente, por lo que la cantidad de cargas positivas en la superficie de las nanopartículas será menor que la cantidad de cargas de la solución de hidrocloreto de quitosano sin TPP.

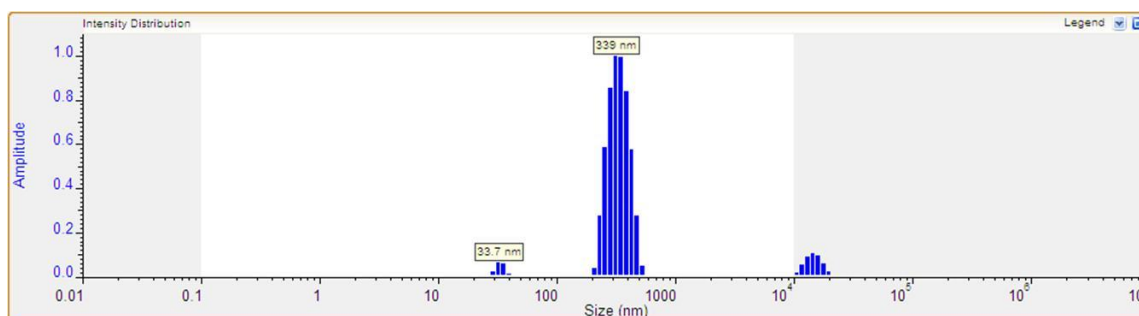


Figura III.44. Distribución de tamaño de nanopartículas de HCS-TPP resuspendidas en HBSS. El resultado representa una media de 10 determinaciones, realizadas a 25°C.

La determinación de la cantidad de hidrocloreto de quitosano presente en las nanopartículas es otro resultado a tener en cuenta en la caracterización de las mismas. El gran número de cargas positivas que posee el quitosano lo hace susceptible de reaccionar

con colorantes aniónicos como el Cibacron Brilliant Red. Después de aislar las nanopartículas por centrifugación y determinar la cantidad de hidrocloreto de quitosano libre en el sobrenadante por el método colorimétrico descrito por Miralles *et al.* (2009) [108], la concentración media de hidrocloreto de quitosano unido a las nanopartículas fue de $0,056 \pm 0,006\%$ (p/v). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la concentración inicial era de $0,103\%$ (p/v), aproximadamente un 55% del hidrocloreto de quitosano inicial se encontraba formando parte de las nanopartículas. Es decir, la eficacia del método utilizado fue de un 55%.

4.2 Estudios de citotoxicidad

Un parámetro importante a la hora de valorar el potencial de un nuevo vehículo de liberación de fármacos es su toxicidad celular. Teniendo esto en cuenta, se estudió el efecto del hidrocloreto de quitosano en solución y en forma de nanopartículas sobre la actividad metabólica (MTS) y la integridad de la membrana plasmática (LDH) de las células Calu-3.

4.2.1 Ensayo de MTS

En primer lugar se estudió el efecto de diferentes concentraciones de hidrocloreto de quitosano en solución sobre la actividad metabólica de las células Calu-3. Los resultados obtenidos, representados en la Figura III.45, muestran diferencias en la actividad metabólica en función de la concentración de hidrocloreto de quitosano. La actividad metabólica de las células disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control (HBSS) para las concentraciones de HCS $0,010$ - $0,100\%$ (p/v), con una reducción de más del 50%. Concentraciones de HCS más bajas ($0,006$ - $0,002\%$ p/v), sin embargo, tuvieron un menor efecto sobre la actividad metabólica. Las concentraciones de $0,003$ y $0,002\%$ (p/v) no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al control, por lo que no produjeron un efecto adverso sobre las células Calu-3.

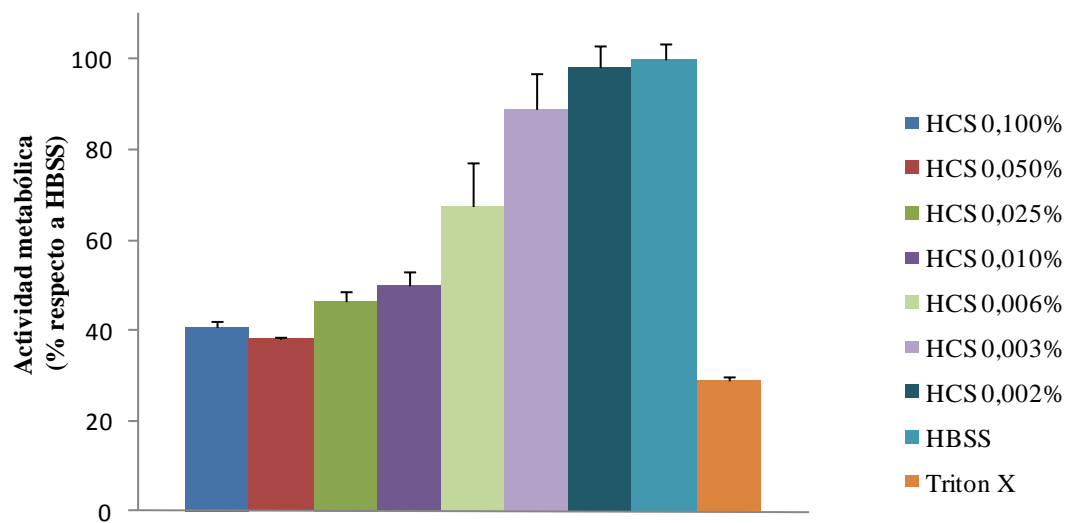


Figura III.45. Efecto de diferentes concentraciones de HCS (0,002-0,100 p/v), del HBSS y del Triton-X sobre la actividad metabólica de Calu-3, medida por MTS. Resultados presentados como media \pm DS (n=4).

Posteriormente, a partir de los datos obtenidos, se comparó el efecto del hidrocloreuro de quitosano en solución con el efecto de las nanopartículas de hidrocloreuro de quitosano sobre la actividad metabólica de las células Calu-3, a las concentraciones de HCS comprendidas entre 0,002 y 0,025% (p/v).

Como muestra la Figura III.46, las concentraciones de HCS de 0,002 y 0,003% p/v, tanto en nanopartículas como en solución de hidrocloreuro de quitosano, no mostraron un efecto supresivo en la actividad metabólica de las células, comparado con el control, (HBSS). Sin embargo, las nanopartículas y la solución de HCS con concentraciones más altas de HCS (0,006-0,025% p/v) mostraron una reducción significativa ($p < 0,05$) de la actividad metabólica celular, comparada con el medio HBSS, siendo esta reducción mayor en el caso del HCS en solución. Por tanto, la concentración de 0,003% (p/v) fue identificada como la concentración de hidrocloreuro de quitosano más alta que no presentó una disminución significativa de la actividad metabólica, tanto en forma de nanopartículas como en solución.

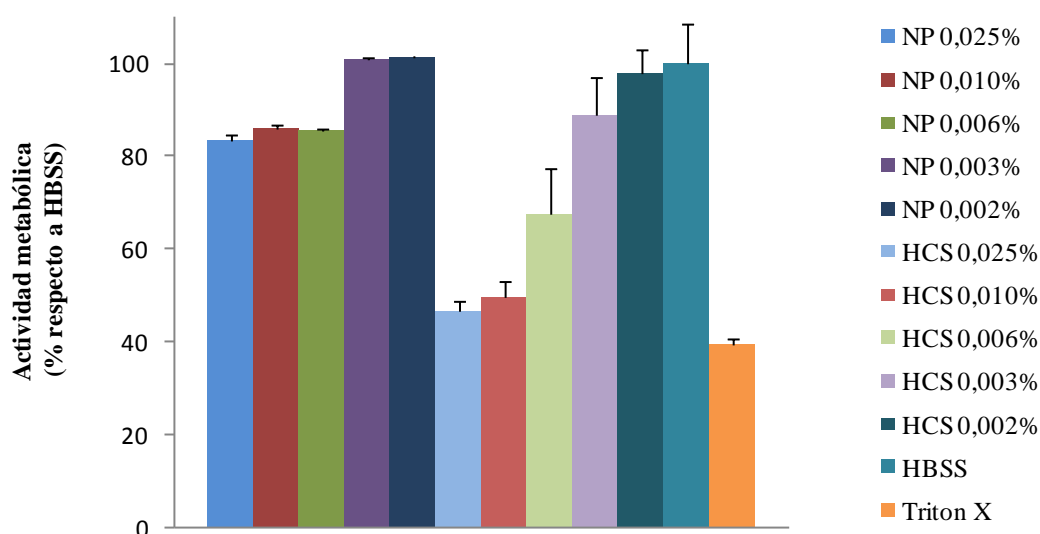


Figura III.46. Efecto de diferentes concentraciones de HCS en forma de nanopartículas (0,002%-0,025 p/v) y en solución (0,002-0,025% p/v), del HBSS y del Triton-X sobre la actividad metabólica de las células Calu-3, determinada por el método MTS. Resultados presentados como media \pm DS (n=4).

4.2.2 Ensayo LDH

Cualquier daño en la membrana plasmática celular se puede determinar indirectamente por la liberación de la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH). Este ensayo se utilizó para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hidrocloreuro de quitosano en solución y en forma de nanopartículas sobre la membrana plasmática.

Como muestra la Figura III.47, se produjo un aumento de liberación de LDH en función de la concentración de hidrocloreuro de quitosano, tanto para la solución como para las nanopartículas. Las nanopartículas con 0,003% (p/v) de HCS, concentración más alta que no afectó al metabolismo celular (ensayo MTS), causaron un incremento del 9,8% en la liberación de LDH en comparación con el control (HBSS), mientras que la solución de hidrocloreuro de quitosano con igual concentración provocó un aumento del 11,3%. Ambas diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control (HBSS), pero las diferencias entre la solución de hidrocloreuro de quitosano y las nanopartículas con dicha concentración no fueron significativas.

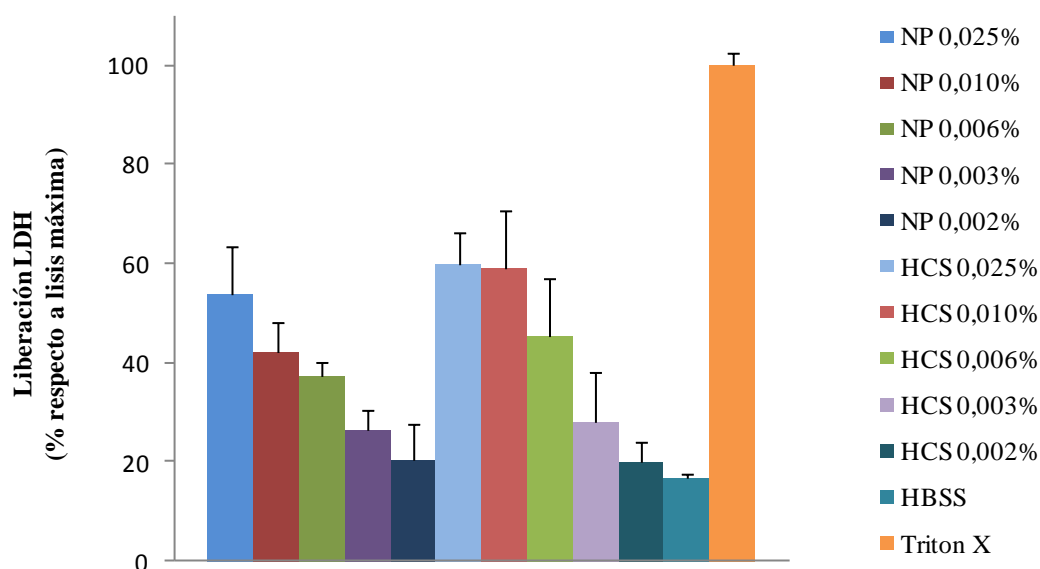


Figura III.47. Efecto de diferentes concentraciones de HCS en forma de nanopartículas (0,002-0,025% p/v) y en solución (0,002-0,025% p/v), del HBSS y del Triton-X sobre la liberación de LDH en células Calu-3. Resultados presentados como media \pm DS (n=4).

La reducción de la actividad metabólica y el incremento de liberación de LDH mostrados en estos resultados pueden estar relacionados con el grado de desacetilación del quitosano y, por tanto, con la densidad de carga del mismo. Aunque las propiedades mucoadhesivas del quitosano sean debidas a sus grupos amino cargados positivamente, debe existir un compromiso entre su capacidad de mucoadhesión y sus efectos adversos sobre las células. Esto estaría en acuerdo con los efectos citolíticos y tóxicos que se han observado en otros polímeros catiónicos con alta densidad de carga, como son: poli-L-lisina, poli-L-arginina y protamina [64].

Excepto para las concentraciones más bajas de hidrocloreto de quitosano, las nanopartículas dieron lugar a un descenso significativo de su citotoxicidad con respecto al polímero en solución. Esto puede ser debido al entrecruzamiento del quitosano con TPP, proceso por el cual disminuye la carga positiva del polímero, como quedó demostrado con los valores de potencial zeta obtenidos. En desacuerdo con estos resultados, Huang *et al.* [138] no describieron diferencias en la citotoxicidad del quitosano en solución y en forma de nanopartículas en células A549.

Aunque el quitosano ha sido muy estudiado como agente mucoadhesivo y promotor de la absorción, sólo existen algunos estudios sobre el efecto de este polímero sobre la viabilidad de las células Calu-3 y otras líneas celulares procedentes del tracto respiratorio.

Se ha descrito que una solución de quitosano de 1,5% (p/v) redujo la viabilidad de células Calu-3 hasta alrededor de un 68% en comparación con el control [139]. Huang *et al.* (2004) [138] observaron que unas nanopartículas, preparadas por un método similar a las obtenidas y testadas en este estudio, indujeron una reducción de la viabilidad en células A549 (procedentes de carcinoma de epitelio alveolar humano) hasta aproximadamente un 70% con una concentración de quitosano del 0,1% (p/v). Por otro lado, Huang *et al.* (2005) [140] describieron que el quitosano, en forma de micropartículas, indujo respuestas proinflamatorias en pulmón de rata. La comparación directa entre estos estudios y el presente trabajo es problemática debido a la variabilidad de los quitosanos utilizados, en términos de peso molecular, grado de desacetilación y tipo de quitosano (quitosano o sal de quitosano). En cualquier caso, otros estudios han descrito una baja toxicidad del quitosano en solución y en forma de nanopartículas en líneas celulares respiratorias [63, 141, 142].

4.3 Estudio de la resistencia transepitelial

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) nos da una indicación de la integridad de las uniones estrechas entre células. Una disminución de la misma puede indicar la apertura de la vía paracelular y dicha disminución debe ser reversible para asegurar que la membrana celular no ha perdido su integridad.

Se realizó un seguimiento de la variación de la TEER en monocapas de células Calu-3 con el fin de estudiar el efecto del hidrocloreuro de quitosano en solución y en nanopartículas sobre la integridad de las uniones estrechas.

La Figura III.48 muestra la disminución de los valores de la TEER con las nanopartículas preparadas con HCS 0,006% p/v durante las dos horas de experimento. Estos valores se mantuvieron bajos aun después de haber retirado las nanopartículas del compartimento donador del soporte permeable. Por lo tanto, para las nanopartículas con esta concentración de hidrocloreuro de quitosano, la TEER no fue reversible después de retirarlas.

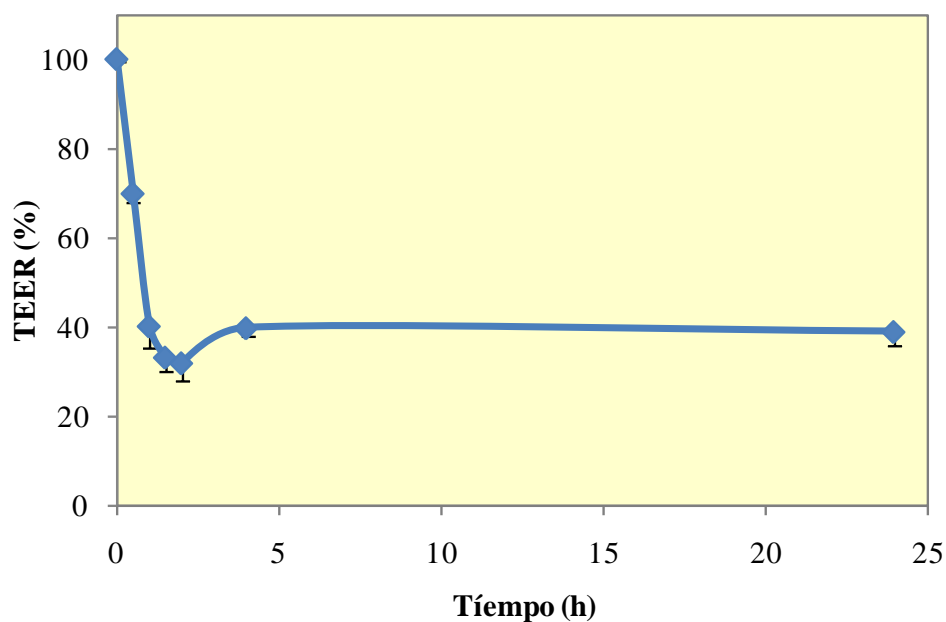


Figura III.48. Efecto de las nanopartículas con 0,006 (p/v) hidrocloreuro de quitosano sobre la TEER de las monocapas de células Calu-3. Resultados mostrados como media \pm DS (n=3).

A continuación, se estudió la capacidad de las suspensiones de nanopartículas y de la solución de hidrocloreuro de quitosano, ambos con la concentración seleccionada en los estudios de citotoxicidad (0,003% p/v de HCS), de disminuir el valor inicial de la TEER de las monocapas de células Calu-3.

En la Figura III.49 se observa que, tanto las nanopartículas como el hidrocloreuro de quitosano en solución provocaron una reducción significativa ($p < 0,05$) de la TEER de las monocapas con respecto a la TEER inicial y con respecto al control (HBSS). Además, el efecto de la solución de hidrocloreuro de quitosano sobre la TEER fue significativamente mayor que el de las nanopartículas ($p < 0,05$). La TEER permaneció baja durante el periodo de tiempo en el que las células fueron incubadas con las muestras (2 horas) (Figura 6A), recuperándose completamente después de 24 horas (Figura 6B). Por lo tanto, el efecto del hidrocloreuro de quitosano a esta concentración fue reversible.

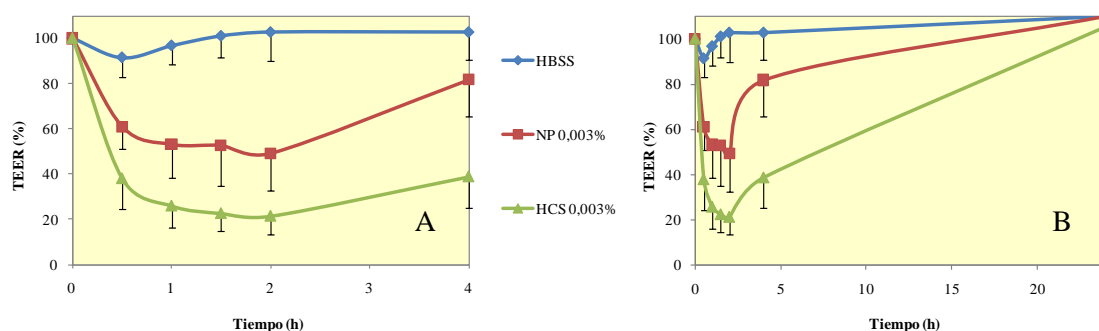


Figura III.49. Efecto de la solución y las nanopartículas de HCS al 0,003% p/v sobre la TEER de las monocapas de células Calu-3. Detalle del efecto sobre TEER hasta 4h (A) y recuperación de TEER tras 24h (B). Datos presentados como media \pm DS (n=3).

El descenso de la TEER se observó tanto con el hidrocloreuro de quitosano en solución como con las nanopartículas, aunque el efecto fue más pronunciado en el caso de la solución. Esto puede ser debido al efecto de la carga superficial positiva, que resultó más alta en la solución que en las nanopartículas. Una mayor cantidad de cargas positivas provoca una interacción más fuerte con las cargas negativas de las membranas celulares. Por tanto, esto puede hacer que el efecto sobre la apertura de las uniones estrechas sea más prominente. La influencia de las cargas positivas del quitosano sobre la absorción ha sido estudiada anteriormente por otros grupos. Shipper *et al.* (1996) [143] observaron que los quitosanos de menor grado de desacetilación y, por tanto, con menos grupos amino libres y menos cargas positivas, promueven menos la absorción. Sadegui *et al.* (2008) [144] estudiaron el efecto de formulaciones basadas en soluciones de quitosano y nanopartículas sobre la TEER de células Caco-2 y explicaron sus resultados basándose en la densidad de carga superficial de las formas particuladas comparada con el quitosano en solución. El quitosano en forma de nanopartículas presentó un efecto menor sobre la TEER porque el potencial zeta de las mismas era menor que el del quitosano en solución.

El descenso de la TEER no implica necesariamente la apertura de las uniones estrechas intercelulares, sino que también puede producirse por efectos citotóxicos. Sin embargo, el hecho de que la TEER se recupere apoya la teoría de la apertura de las uniones.

En la bibliografía existen otros estudios sobre el efecto de las nanopartículas de quitosano sobre la TEER y, por tanto, sobre la apertura de uniones estrechas. Teijeiro-Osorio *et al.* (2009) [145] demostraron la reducción de la TEER de monocapas de células Calu-3 tras la aplicación de nanopartículas de quitosano/ ciclodextrina. El descenso de la TEER es más bajo (hasta un $33,82 \pm 5,98\%$ del valor inicial) en comparación con los resultados

obtenidos en este trabajo (~50% de la TEER inicial), aunque la dosis de nanopartículas empleada en el primer estudio contenía una cantidad de quitosano mayor (~22,07 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de la monocapa) que en el presente estudio (13,64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Estos autores observaron una mejora en la reducción de glucosa en sangre en ratas después de la administración de las nanopartículas cargadas con insulina. Explican los resultados por una combinación de varios factores, incluyendo la apertura de uniones estrechas, la translocación de nanopartículas a través de la mucosa nasal y la protección de la insulina incorporada contra la degradación enzimática.

Por otro lado, un estudio realizado por Bravo-Osuna *et al.* (2008) [146] investiga el efecto del quitosano en solución, de nanopartículas de quitosano y nanopartículas de cianoacrilato recubiertas de quitosano tiolado sobre la permeabilidad y la TEER de mucosa procedente de yeyuno de rata. Los resultados muestran un descenso de la TEER y una mejora del transporte paracelular de manitol con las soluciones de ambos tipos de quitosano y con las nanopartículas recubiertas con quitosano tiolado, pero no con las recubiertas con quitosano. Los autores explican que la fuerza mucoadhesiva de las nanopartículas de quitosano provoca la inmovilización de las mismas en la capa de mucus, por lo que no pueden difundir dentro de ella y llegar a las proteínas de las uniones estrechas, lo cual es imprescindible para la apertura de las uniones estrechas. En el caso de las nanopartículas de quitosano tiolado, observan que tienen una fuerza mucoadhesiva más baja en comparación con las anteriores y sólo una parte de ellas interactúa fuertemente con la capa de mucus. Las demás, que no se encuentran adheridas al mucus, difunden y llegan a las uniones estrechas, mejorando así la permeabilidad paracelular. En el presente trabajo, aunque se empleó un modelo epitelial basado en células productoras de mucus (células Calu-3), se observó un importante efecto sobre las uniones estrechas. Estas diferencias pueden deberse a varios factores, como son el uso de hidrócloruro de quitosano en lugar de quitosano y el de un modelo de monocapas de células epiteliales en lugar de un tejido mucoso.

Así mismo, existen estudios en los que no se ha observado ningún efecto de las nanopartículas de quitosano sobre la TEER de monocapas de distintas líneas celulares. Grenha *et al.* (2007) [142] estudiaron el efecto de nanopartículas de quitosano-TPP, incorporadas en micropartículas por atomización, sobre la TEER de células Calu-3. No observaron ningún efecto sobre las uniones estrechas (TEER) para la concentración máxima de nanopartículas que utilizaron (1,3mg/ml nanopartículas, correspondientes a

150 μg de quitosano). Otro estudio que empleó nanopartículas de quitosano y células Caco-2 tampoco mostró cambios significativos sobre las uniones estrechas [147]. Dyer *et al.* (2002) [20] observaron que las nanopartículas insulina-quitosano eran significativamente menos efectivas en la disminución de los niveles de glucosa en sangre en ratas y ovejas que la formulación basada en solución de quitosano.

Sin embargo, Fernandez-Urrusuno *et al.* (1999)[33] observaron una eficiencia mayor de las nanopartículas cargadas con insulina en comparación con las soluciones de quitosano en su efecto sobre la absorción por la vía de administración nasal. Lim *et al.* (2001) observaron un descenso de la TEER del 50-60% en células 16HBE14o tras su incubación con una solución de glutamato de quitosano (10 mg/ml) y micropartículas (2–3 mg).

4.4 Ensayos de permeabilidad celular

El hidrocloreuro de quitosano a una concentración de 0,003% (p/v) en forma de nanopartículas y en solución se seleccionó para estudiar su efecto sobre el transporte de dos moléculas hidrofílicas modelo de diferente peso molecular a través de monocapas de células Calu-3. Se utilizó dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FD4 y FD10) como modelo.

La Figura III.50 muestra la permeabilidad de FD4 y FD10 en presencia de solución de HCS o nanopartículas de HCS y la permeabilidad en ausencia de HCS. Tanto las nanopartículas como la solución de HCS aumentaron significativamente la permeabilidad de FD4 y FD10 ($p < 0,05$).

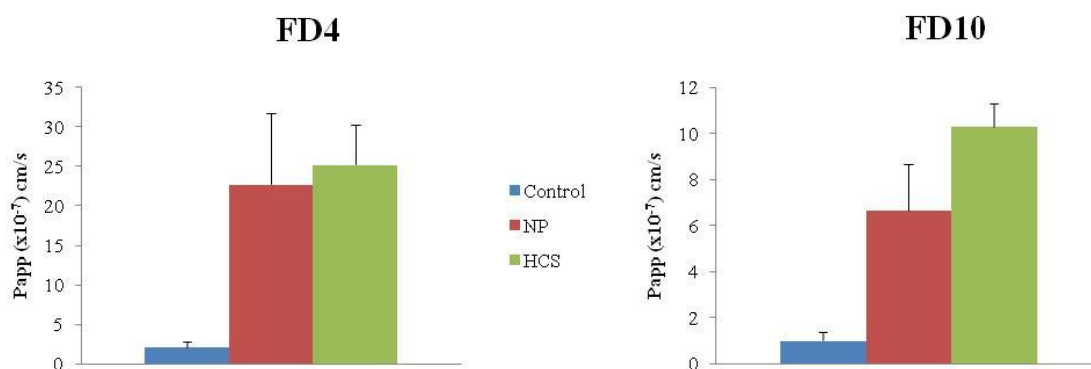


Figura III.50. Efecto de las nanopartículas de HCS y la solución de HCS sobre la permeabilidad de FD4 y FD10 a través de monocapas de células Calu-3. Resultados expresados como media+DS (n=3).

La permeabilidad de FD4 fue de $2,27 \cdot 10^{-6}$ cm/s cuando se añadió junto con las nanopartículas y $2,53 \cdot 10^{-6}$ cm/s cuando se añadió a la solución de HCS. Por tanto, con

nanopartículas y con solución resultó 10,7 y 11,9 veces más alta con respecto al control ($2,13 \cdot 10^{-7}$ cm/s). En el caso de FD10, las nanopartículas mostraron una permeabilidad de $6,67 \cdot 10^{-7}$ cm/s y la solución de $1,03 \cdot 10^{-6}$ cm/s, es decir, 6,5 y 10,1 veces más alta que el control ($1,02 \cdot 10^{-7}$ cm/s) respectivamente.

Por lo tanto, las nanopartículas y el hidrocloreto de quitosano en solución presentaron un efecto promotor de la absorción significativamente más bajo para FD10 que para FD4 ($p < 0,05$). Tanto para FD10 como para FD4, el efecto promotor de la absorción de las nanopartículas fue menor que el del hidrocloreto de quitosano en solución, aunque la diferencia sólo fue significativa para el FD10.

A la vista de los resultados podemos decir que existe un menor efecto modulador de las uniones estrechas por parte de las nanopartículas y esto concuerda con los resultados obtenidos para la TEER, la cual se vio menos afectada con nanopartículas que con solución de hidrocloreto de quitosano. Además, probablemente sea necesario provocar un mayor efecto sobre las uniones estrechas para promover la permeabilidad de FD10 teniendo en cuenta su mayor peso molecular.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sadegui *et al.* (2008)[144], en los que tanto la solución de quitosano como las nanopartículas promovieron la absorción de insulina a través de células Caco-2, aunque el efecto de las nanopartículas sobre el transporte fue mucho menor. Estos autores explican sus resultados por la menor reducción de la TEER causada por las nanopartículas y por los valores de potencial zeta obtenidos, que eran menores que los del quitosano en solución. Los valores de potencial zeta obtenidos en el presente estudio también fueron menores para las nanopartículas.

4.5 Conclusiones parciales del capítulo

- Los resultados obtenidos muestran que las nanopartículas de hidrocloreto de quitosano tienen un efecto promotor de la permeabilidad similar al del hidrocloreto de quitosano en solución para una macromolécula de 4kDa, pero inferior al hidrocloreto de quitosano en solución para una macromolécula de 10kDa.
- Las nanopartículas de hidrocloreto de quitosano seleccionadas abren de forma reversible las uniones estrechas de las células Calu-3 y promueven la

permeabilidad de macromoléculas a través de las mismas sin inducir efectos tóxicos irreversibles.

IV. CONCLUSIONES

El interés de esta tesis surgió directamente del interés del sector farmacéutico para generar conocimiento en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de principios activos, por lo que los resultados obtenidos tienen un potencial carácter aplicado. Se han obtenido resultados con interesantes aportes e innovaciones en el campo de la tecnología farmacéutica.

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Se han obtenido microesferas de hidrocloreto de quitosano con claritromicina por atomización, con altas eficiencias de encapsulación, lo cual hace posible la utilización de esta técnica en la industria farmacéutica.
- El uso de agentes entrecruzantes permitió controlar la liberación de claritromicina en el tiempo. Se alcanzó un grado de entrecruzamiento óptimo tanto con tripolifosfato sódico como con genipina, liberándose un 95% y un 85% de claritromicina en 8 horas, respectivamente.
- Se han obtenido microesferas de hidrocloreto de quitosano por atomización con hidrocloreto de tramadol y entrecruzadas con genipina, agente entrecruzante de origen natural.
- El uso de la genipina permitió controlar la liberación de hidrocloreto de tramadol, principio activo hidrosoluble, en el tiempo y reducir el efecto estallido al inicio de la liberación. Se alcanzó un grado de entrecruzamiento óptimo con genipina 20mM. Por tanto, el quitosano y la genipina constituyen un buen sistema de liberación controlada del principio activo.
- Las microesferas obtenidas mantienen las propiedades mucoadhesivas del quitosano, ya que presentaron una carga superficial positiva. Por tanto, estos sistemas pueden favorecer la absorción del fármaco a través del epitelio correspondiente.
- Se han obtenido películas de quitosano con hidrocloreto de ciprofloxacino para su uso a nivel tópico.
- El uso de tripolifosfato sódico como agente entrecruzante de las películas permitió controlar la liberación del fármaco, disminuyendo ésta notablemente con el tiempo de entrecruzamiento y la concentración de

TPP. Se alcanzó un grado de entrecruzamiento óptimo con 1% (p/v) TPP y a tiempos de entrecruzamiento cortos, liberándose menos del 60% del fármaco en 24 horas.

- Se ha demostrado el efecto del quitosano como modulador de las uniones estrechas intercelulares y como promotor de la absorción de macromoléculas, sin inducir efectos tóxicos irreversibles. Las nanopartículas, aunque en menor medida que el quitosano, también muestran estas propiedades, por lo que constituyen un sistema de encapsulación adecuado para macromoléculas terapéuticas, tales como los fármacos proteicos.
- Aunque no hay una mejora de la permeabilidad con el uso de las nanopartículas, puede ser ventajoso liberar las biomacromoléculas a través de superficies mucosas incorporándolas en las nanopartículas. Éstas pueden proteger al principio activo de la degradación enzimática, prolongar el tiempo de contacto con la mucosa y controlar su liberación.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Sanidad y Consumo, Monografías de formas farmacéuticas. Formas farmacéuticas. in: Real Farmacopea Española. 3ª Edición. Madrid, 2005, pp. 645.
- [2] X. Ding, A.W.G. Alani, J.R. Robinson, Extended-release and targeted drug delivery system, in: D.B. Troy (Ed.), The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Remington, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2002, pp. 939-964.
- [3] J. Doménech, E. Escribano, Preparados orales de cesión modificada: cinética, in: J. Doménech, J. Martínez and J.M. Pla (Eds.), Biofarmacia y Farmacocinética. Vol II. Síntesis, Madrid, 1998, pp. 317-347.
- [4] M.T. Viseras Iborra, Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico con halloysita, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada (2008).
- [5] I. Paños, Diseño de sistemas hidrofílicos basados en quitosano para la liberación específica de moléculas activas a nivel del tracto gastrointestinal, Departamento de Física-Química, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (2007).
- [6] I. Paños, N. Acosta, A. Heras, New drug delivery systems based on chitosan, Curr. Drug Discov. Tech. 5 (2008) 333-341.
- [7] K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, K. and Ogawa, Structural diversities of chitosan and its complexes, Carbohydr. Polym. 41 (3) (2000) 237-247.
- [8] M.G. Peter, Applications and environmental aspects of chitin and chitosan, J. M. S. Pure Appl. Chem. A32 (4) (1995) 629-640.
- [9] N. Acosta, C. Jiménez, V. Borau, A. Heras, Extraction and characterization of chitin from crustaceans, Biomass and Bioenergy 5 (2) (1993) 145-153.
- [10] I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, Current Chemical Biology 3 (2) (2009) 203-230.
- [11] E. Agulló, R. Mato, C. Peniche, C. Tapia, A. Heras, J. San Román, W. Arquielles, F. Goycoolea, A. Mayorga, J. Nakamatsu, A.P. de Abram, Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, 2004.

- [12] H.K. No, S.P. Meyers, Application of chitosan for treatment of waste-waters, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 163 (2000) 1-28.
- [13] I. Helander, E. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71 (2001) 235-244.
- [14] M.N.V.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem. Rev.* 104 (2004) 6017-6084.
- [15] L. Illum, Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1326-1331.
- [16] X.Z. Shu, K.J. Zhu, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery, *Int. J. Pharm.* 201 (2000) 51-58.
- [17] Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 4ªEd.2002.
- [18] H. Hirano, Y. Seino, Akiyama, Y. Nonaka, Quitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in: C.G. Gebelein and R.L. Dunn (Eds.), *Progress in Biomedical Polymers*, Plenum Press, New York, 1990, pp. 283-289.
- [19] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Controlled Release* 100 (2004) 5-28.
- [20] A.M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, L. Illum, Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19 (7) (2002) 998-1008.
- [21] V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kauskik, R. Kumria, Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.* 274 (2004) 1-33.
- [22] S. Dhawan, A.K. Singla, V.R. Sinha, Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods, *AAPS Pharm. Sci. Tech* 5 (4) (2004) 1-7.
- [23] Y.J. Fu, F.L. Mi, T.B. Wong, S.S. Shyu, Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly (D,L-lactide) microparticles by spray drying technique, *J. Microencapsulation* 18 (2001) 733-747.

- [24] S. Zgoulli, V. Grek, G. Barre, G. Goffinet, PH. Thonart, S. Zinner, Microencapsulation of erythromycin and clarithromycin using a spray-drying technique, *J. Microencapsulation* 16(5) (1999) 565-571.
- [25] P. He, S.S. Davis, L. Illum, Chitosan microspheres prepared by spray drying, *Int. J. Pharm.*, 187 (1999) 53-65.
- [26] A. Chawla, K.M.G. Taylor, J.M. Newton, M.C.R. Johnson, Production of spray dried salbutamol sulphate for use in dry powder aerosol formulation, *Int. J. Pharm.* 108 (1994) 233-240.
- [27] L. Illum, N.F. Farraj, S.S. Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1186-1189.
- [28] F. Pavenetto, I. Genta, P. Giunchedi, B. Conti, U. Conte, Spray dried albumin microspheres for the intra-articular delivery of dexamethasone, *J. Microencapsulation* 11 (1994) 445-454.
- [29] G. Lambert, E. Fattal, P. Couvreur, Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47(1) (2001) 99-112.
- [30] Y. Ohya, M. Shiratani, H. Kobayashi, T. Ouchi, Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity, *Pure Appl. Chem.* 31 (1994) 629-642.
- [31] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Pol. Sci.* 63 (1997) 125-132.
- [32] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44 (2005) 65-73.
- [33] R. Fernández-Urrusuno D., P. Calvo, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Development of a freeze dried formulation of insulin-loaded chitosan nanoparticles intended for nasal administration, *S. T. P. Pharma. Sci.* 5 (1999) 429-436.
- [34] A. Vila, A. Sánchez, K. Janes, I. Behrens, T. Kissel, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 123-131.

- [35] Y. Pan, Y. Li, H. Zhao, J. Zheng, H. Xu, G. Wei, J. Hao, F. Cui, Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 139-147.
- [36] Y. Wu, W. Yang, C. Wand, J. Ju, S. Fu, Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate, *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 235-245.
- [37] W. Argüelles, Estudio de tres propiedades básicas de la quitina, (1991).
- [38] P.R. Austin, United States Patent 4309534 (1983).
- [39] R.A.A. Muzzarelli, Chitosan membranes, *Ion. Exch. Membr.* (1974).
- [40] R.A.A. Muzzarelli, R. Rocchetti, Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.*, 5 (1985) 461-472.
- [41] M. Berger, United States Patent 4383022 (1983).
- [42] C.B. Abletshauser, R. Schneider, H. Rupprecht, Film coating of pellets with insoluble polymers obtained in situ crosslinking in the fluidized bed, *J. Controlled Release*, 27 (1993) 149-156.
- [43] C. Remuñán-López, R. Bodmeier, Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films, *J. Controlled Release* 44 (1997) 215-225.
- [44] S. Aoyagi, H. Onishi, Y. Machida, Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds, *Int. J. Pharm.* 330 (2007) 138-145.
- [45] M. Jmaa, F.H. Furkert, B.W. Mueller, A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 53 (2002) 115-123.
- [46] M.T. Qurashi, H.S Blair, S.J Allen, Studies on modified chitosan membranes I. Preparation and characterization, *J. Appl. Pol. Sci.* 46 (2) (1992) 255-261.
- [47] R.A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 167-182.
- [48] R.F. Diegelman, Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds, *Wound. Rep. Reg.* 4 (1996) 48-52.

- [49] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials* 22 (2001) 261-268.
- [50] M. Burkatovskaya, G.P. Tegos, E. Swietlik, T.N. Demidova, A.P. Castano, M.R. Hamblin, Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice, *Biomaterials* 27 (2006) 4157-4164.
- [51] J. Comyn, Introduction to polymer permeability and the mathematic of diffusion, in: J. Comyn (Ed.), *Polymer Permeability*, Elsevier Applied Science Publishers, 1985, pp. 1-11.
- [52] N.A. Peppas, A.R. Khare, Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993) 1-35.
- [53] H. Schott, Swelling kinetics of polymers, *J. Macromol. Sci, Part B: Phys* 22 (2) (1992) 1-9.
- [54] J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, K. Yamamoto, G.E. Peck, Physical properties and molecular behavior of chitosan films, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 143-157.
- [55] M.M. Issa, M. Köping-Höggård, P. Artursson, Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs, *Drug Discov. Today: Technologies*, 2 (2005) 1-6.
- [56] L. Illum, I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, A.N. Fisher, S.S. Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 51 (2001) 81-96.
- [57] R.J. Soane, M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis, L. Illum, Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans, *Int. J. Pharm.*, 178 (1999) 55-65.
- [58] P. He, S.S. Davis, L. Illum, In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.*, 166 (1998) 75-88.
- [59] G. Borchard, H.L. Lueßen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, C. Lehr, The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan- glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro, *J. Controlled Release* 39 (1996) 131.
- [60] R.J. Majithiya, R.S. Ramchandra, Chitosan-based mucoadhesive microspheres of clarithromycin as a delivery system for antibiotic to stomach, *Curr. Drug Delivery* 2 (2005) 235-242.

- [61] K. Matter, M.S. Balda, Functional analysis of tight junctions, *Methods* 30 (2003) 228-234.
- [62] P.D. Ward, T.K. Tippin, D.R. Thakker, Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions, *Pharm. Sci. Technol. Today* 3 (2000) 346-358.
- [63] J.M. Smith, M. Dornish, E.J. Wood, Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption, *Biomaterials* 26 (2005) 3269-3276.
- [64] G. Ranaldi, I. Marigliano, I. Vespignani, G. Perozzi, Y. Sambuy, The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 157-167.
- [65] B.I. Florea, M.L. Cassara, H.E. Junginger, G. Borchard, Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3, *J. Controlled Release*, 87 (2003) 131-138.
- [66] B. Forbes, Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies, *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3 (2000) 18-27.
- [67] N.R. Mathias, F. Yamashita, V.H.L. Lee, Respiratory epithelial cell culture models for evaluation of ion and drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 22 (1996) 215-249.
- [68] N.R. Mathias, J. Timoszyk, P.I. Stetsko, J.R. Megill, R.L. Smith, D.A. Wall, Permeability characteristics of Calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats, *J. Drug Target.* 10 (2002) 31-40.
- [69] C. Meany, B.I. Florea, G. Borchard, H.E. Junginger, Characterization of a human submucosal gland cell line (Calu-3) as an in vitro model for the airway epithelium, *Proc. Intl. Symp. Control. Release. Bioact. Mater.* 26 (1999) 198-199.
- [70] I. Pezron, R. Mitra, D. Pal, A.K. Mitra, Insulin aggregation and asymmetric transport across human bronchial epithelial cell monolayers (Calu-3), *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 1135-1146.
- [71] M.E. Cavet, M. West, N.L. Simmons, Transepithelial transport of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human airway epithelial Calu-3 cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 2693-2698.
- [72] R.A.A. Muzzarelli, Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 1-9.

- [73] R. Bodmeier, K.H. Oh, Y. Pramar, Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15 (1989) 1475-1494.
- [74] J.A. Ko, H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, J.S. Lee, Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 165-174.
- [75] F.L. Mi, S.S. Shyu, S.T. Lee, T.B. Wong, Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, *J. Polym. Sci, Part B:Polym Phys* 37 (1999) 1551-1564.
- [76] J.A. Dean, *Lange's Handbook of Chemistry* 13th Edition, McGraw-Hill, New York, 1972.
- [77] M.F. Butler, Y. NG, P.D.A. Pudney, Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, *J. Polym. Sci, Part A:Polym. Chem.* 41 (2003) 3941-3953.
- [78] H.W. Sung, R.N. Huang, L.L.H. Huang, C.C. Tsai, In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation, *J. Biomater. Sci. Polym.* 10 (1999) 63-74.
- [79] F. Mi, H. Sung, S. Shyu, Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent, *Carbohydr. Polym.*, 48 (2002) 61-72.
- [80] F. Mi, H. Sung, S. Shyu, C. Su, C. Peng, Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads, *Polymer* 44 (2003) 6521-6530.
- [81] K. Barck, M.F. Butler, Comparison of morphology and properties of polyelectrolyte complex particles formed from chitosan and polyanionic biopolymers, *J. Appl. Pol. Sci.* 98 (2005) 1581-1593.
- [82] H.M. Chen, W. Ouyang, B. Lawuyi, S. Prakash, Genipin crosslinked alginate-chitosan microcapsules: membrane characterization and optimization of crosslinking reaction, *Biomacromolecules* 7 (2006) 2091-2098.
- [83] M.J. Moura, M.M. Figueiredo, M.H. Gil, Rheological study of genipin crosslinked chitosan hydrogels, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3823-3829.

- [84] S. Chen, Y. Wu, F. Mi, Y. Lin, L. Yu, H. Sung, A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery, *J. Controlled Release* 96 (2004) 285-300.
- [85] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, Release of indomethacin from a novel chitosan microspheres prepared by a naturally occurring crosslinker: examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction, *J. Appl. Pol. Sci.* 81 (2001) 1700-1711.
- [86] Y. Yuan, B.M. Chesnutt, G. Utturkar, W.O. Haggard, Y. Yang, J.L. Ong, J.D. Bumgardner, The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release, *Carbohydr. Polym.* 68 (2007) 561-567.
- [87] R. Hejazi, M. Amiji, Chitosan-based gastrointestinal delivery systems, *J. Controlled Release* 89 (2003) 151-165.
- [88] Y. Boonsongrit, A. Mitrevej, B.W. Mueller, Chitosan drug binding by ionic interaction, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62 (2006) 267-274.
- [89] D. Jain, E. Carvalho, R. Banerjee, Biodegradable hybrid polymeric membranes for ocular drug delivery, *Acta Biomater.* doi: 1.1016/j.actbio.2009.11.001 (2009) .
- [90] C.A. Ogawa, A.M. Plepis, Liberação *in vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno, *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 12 (2002) 115-122.
- [91] Costa, P. and Sousa Lobo, J.M., Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2) (2001) 123-133.
- [92] Gibaldi, M. and S. Feldman, Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms, *J. Pharm. Sci* 56 (10) (1967) 1238-1242.
- [93] T. Higuchi, Mechanism of sustained- action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci* 52 (12) (1963) 1145-1149.
- [94] A.W. Hixon, J.H. Crowell, Dependence of reaction velocity upon surface and agitation, *Ind. Eng. Chem.* 23 (1931) 923-931.
- [95] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E.M. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25-35.

- [96] N.A. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharm. Acta Helv.* 60 (1985) 110-111.
- [97] J.L. Escobar, D.M. García, D. Zaldivar e I. Katime, Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos, *Revista iberoamericana de polímeros* 3 (3) (2002) 1-25.
- [98] R.W. Baker, H.S. Lonsdale, Controlled release: mechanisms and rates, in: A.C. Taquary and R.E. Lacey (Eds.), *Controlled release of biologically active agents*, Plenum Press, New York, 1974, pp. 15-71.
- [99] T. Seki, Controlled release of 3,5-diester prodrugs of 5-fluoro-2-deox-2'-deoxyuridine from poly-L-lactic acid microspheres, *J. Pharm. Sci.* 79(11) (1990) 985-987.
- [100] Zeta potential. An introduction in 30 mnutes. Nota técnica disponible en www.malvern.com.uk. .
- [101] R.H. Müller, Zetapotential, in: R.H. Muller (Ed.), *Zetapotential and Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1996, pp. 19-99.
- [102] L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin, C.M. Conrad, An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer, *Text. Res. J.* 29 (1959) 786-794.
- [103] B. Focher, P.L. Beltrame, A. Naggi, G. Tori, Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications, *Carbohydr. Polym.* 12 (1990) 405-418.
- [104] K.V. Harish Prashanth, F.S. Kittur, R.N. Tharanathan, Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions, *Carbohydr. Polym.* 50 (2002) 27-33.
- [105] F.S. Kittur, A.B. Vishu Kumar, R.N. Tharanathan, Low molecular weight chitosans—preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1283-1290.
- [106] G. Galed, Biopolímeros quitina/quitosano: optimización de los procesos de obtención y caracterización funcional, Dpto Física-Química II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (2005).

- [107] F.L. Mi, Y.C. Yan, H.C. Liang, R.N. Huang, H.W. Sung, In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin, *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed 12 (2001) 835-850.
- [108] B. Miralles, M. Mengibar, R. Harris, A. Heras, Suitability of a colorimetric method for the selective determination of chitosan in dietary supplements, *Food Chem.* (Accepted July 2009. Ref: FOODCHEM-D-09-01275R1).
- [109] United States Pharmacopeia, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, USA, 2006.
- [110] E. Gavini, G. Rasso, C. Muzzarelli, M. Cossu, P. Giunchedi, Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 245-252.
- [111] A. Martinac, J. Filipovic-Grcic, D. Voinovich, B. Perissutti, E. Franceschini, Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int. J. Pharm.* 291 (2005) 69-77.
- [112] P. Giunchedi, C. Juliano, E. Gavini, M. Cossu, M. Sorrenti, Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (2002) 233-239.
- [113] F. Pavanetto, B. Conti, I. Genta, P. Giunchedi, Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation, *Int. J. Pharm.* 84 (1992) 151-159.
- [114] E. Gavini, A.B. Hegge, G. Rasso, V. Sanna, C. Testa, G. Pirisino, J. Karlsen, P. Giunchedi, Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 9-15.
- [115] H.K. Stulzer, M.P. Tagliari, A.L. Parize, M.A.S. Silva, M.C.M. Laranjeira, Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying, *Mater. Sci. Eng.: C* 29 (2009) 387-392.
- [116] P. Giunchedi, I. Genta, B. Conti, R.A.A. Muzzarelli, U. Conte, Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres, *Biomaterials* 19 (1998) 157-161.
- [117] K.G.H. Desai, H.J. Park, Preparation and characterization of drug loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying, *Drug Dev. Res.* 64 (2005) 114-128.

- [118] C.A. Ventura, S. Tommasini, E. Crupi, I. Giannone, V. Cardile, T. Musumeci, G. Puglisi, Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, 68 (2008) 235-244.
- [119] Y. Pan, Y. Li, H. Zhao, J. Zheng, H. Xu, G. Wei, J. Hao, F. Cui, Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 139-147.
- [120] A.K. Anal, W.F. Stevens, C. Remuñán-López, Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin, *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 166-173.
- [121] J.A. Ko, H.J. Park, Y.S. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, Chitosan microparticle preparation for controlled drug release by response surface methodology, *J. Microencapsulation* 20 (2003) 791-797.
- [122] F.L. Mi, H. Sung, S. Shyu, Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker, *J. Polym. Sci, Part A:Polym. Chem.* 38 (2000) 2804-2814.
- [123] J.B. Lambert, *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice Hall International Ltd., New York, 1998.
- [124] A. Bernkop-Schnürch, Mucoadhesive systems in oral drug delivery, *Drug Discov. Today: Technologies* 2 (2005) 83-87.
- [125] F.L. Mi, S.S. Shyu, Y.B. Wu, S.T. Lee, J.Y. Shyong, R.N. Huang, Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing, *Biomaterials* 22 (2) (2001) 165-173.
- [126] X.Z. Shu, K.J. Zhu, W. Song, Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 19-28.
- [127] X.Z. Shu, K.J. Zhu, The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 235-243.
- [128] K. Kurita, T. Sannan, Y. Iwakura, Studies on Chitin, 4, *Macromol. Chem.* 178 (1977) 3197-3202.

- [129] Q. Wang, Z. Dong, Y. Du, J.F. Kennedy, Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 336-343.
- [130] E. Pretsch, T. Clero, J. Seibl, W. Simon, *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*, Alhambra Longman, S.A., Madrid, 1993.
- [131] Q. Wang, Z. Dong, Y. Du, J. Kennedy, Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 336-343.
- [132] Peppas, N.A. and Korsmeyer, R.W, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, CRC Press, 1986.
- [133] L. Illum, Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions, *J. Controlled Release*, 87 (2003) 187-198.
- [134] V. Dodane, M.A. Khan, J.R. Merwin, Effect of chitosan on epithelial permeability and structure, *Int. J. Pharm.* 182 (1999) 21-32.
- [135] P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis, L. Illum, Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharm. Res.* 11 (1994) 1358-1361.
- [136] C. Lehr, J.A. Bouwstra, E.H. Schacht, H.E. Junginger, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *Int. J. Pharm.*, 78 (1992) 43-48.
- [137] S. Papadimitriou, D. Bikiaris, K. Avgoustakis, E. Karavas, M. Georgarakis, Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole, *Carbohydr. Polym.* , 73 (2008) 44-54.
- [138] M. Huang, E. Khor, L.Y. Lim, Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation, *Pharm. Res.* 21 (2004) 344-353.
- [139] B.I. Florea, M. Thanou, H.E. Junginger, G. Borchard, Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation, *J. Controlled Release*, 110 (2006) 353-361.

- [140] Y.C. Huang, A. Vieira, K.L. Huang, M.K. Yeh, Pulmonary inflammation caused by chitosan microparticles, *J. Biomed. Mater. Res.* 75A (2005) 283-287.
- [141] Z. Ma, L.Y. Lim, Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: A comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 20 (2003) 1812-1819.
- [142] A. Grenha, C.I. Grainger, L.A. Dailey, B. Seijo, G.P. Martin, C. Remuñán-López, B. Forbes, Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 31 (2007) 73-84.
- [143] N.G.M. Schipper, K.M. Varum, P. Artursson, Chitosans of absorption enhancers of poorly absorbable drugs: Influence of molecular weight and degree of acetylation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (1996) S153-S153.
- [144] A.M.M. Sadeghi, F.A. Dorkoosh, M.R. Avadi, M. Weinhold, A. Bayat, F. Delie, R. Gurny, B. Larijani, M. Rafiee-Tehrani, H.E. Junginger, Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: Comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 270-278.
- [145] D. Teijeiro-Osorio, C. Remuñán-López, M.J. Alonso, New Generation of Hybrid Poly/Oligosaccharide Nanoparticles as Carriers for the Nasal Delivery of Macromolecules, *Biomacromolecules* 10 (2009) 243-249.
- [146] I. Bravo-Osuna, C. Vauthier, H. Chacun, G. Ponchel, Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 436-444.
- [147] I. Behrens, A.I. Vila Pena, M.J. Alonso, T. Kissel, Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: The effect of mucus on particle absorption and transport, *Pharm. Res.* 19 (2002) 1185-1193.